

ÜBER DIE MOLEKULARE WIRKUNG VON AUXIN

Biochemische Untersuchungen an isolierten Membranen
aus *in vitro* kultivierten Zellen von *Daucus carota* L.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Zbell
aus Leipzig
1983

UNIV.
LIBRARY
1911



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546623_0003

Druck: Copy-Center in Dahlem

Ladenbergstraße 2-4

1000 Berlin 33

Tel. 831 40 25

ÜBER DIE MOLEKULARE WIRKUNG
VON AUXIN

Biochemische Untersuchungen an isolierten Membranen
aus *in vitro* kultivierten Zellen von *Daucus carota* L.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Zbell
aus Leipzig
1983

1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert (Freie Universität Berlin)
2. Referent: Prof. Dr. A. Hager (Universität Tübingen)

Tag der mündlichen Prüfung: **22.12.1983**

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen.....	VI
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	5
2.1. Chemikalien.....	5
2.2. Radiochemikalien.....	8
2.3. Zellkulturen von <i>Daucus carota</i> L.	8
2.3.1. Isolierung und Kultivierung von Zellsuspensionen.....	8
2.3.2. Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht	10
2.4. Präparation von subzellulären Membran- fraktionen aus DC-Zellen.....	10
2.4.1. Mikrosomale Membranfraktion.....	11
2.4.2. Membranfraktionen mit definierter Schwebbedichte.....	12
2.5. Auxinbindungstests.....	13
2.5.1. Prinzip des Hormonbindungstests.....	13
2.5.2. Zentrifugation.....	14
2.5.3. Filtration.....	16
2.5.4. Gleichgewichtsdialyse.....	16
2.6. Flüssigszintillationsmessungen.....	17
2.7. Enzymatische Tests.....	17
2.7.1. Protonenpumpe.....	17
2.7.2. Phospholipase C (EC 3.1.4.3 bzw. EC 3.1.4.10).....	18
2.7.3. Phospholipase D (EC 3.1.4.4).....	19
2.7.4. Phosphatidylsäurephosphatase (EC 3.1.3.4)..	20
2.7.5. NADPH-Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.2.3)...	21

2.8. Freisetzung von membrangebundenem Phosphat.....	21
2.9. Phosphatbestimmung.....	21
2.10. Proteinbestimmung.....	22
3. Versuche und Ergebnisse.....	23
3.1. Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.....	23
3.1.1. Methodik und Nachweis.....	23
3.1.2. Phänomen und Eigenschaften der ethanolsensitiven Auxinbindung.....	25
3.2. Die hochaffine Auxinbindung am E.R.	28
3.2.1. Nachweis.....	28
3.2.2. Eigenschaften.....	30
3.3. Die anionenstimulierbare Protonenpumpe am E.R. ..	32
3.3.1. Nachweis.....	32
3.3.2. Energiesubstratspezifität.....	35
3.3.3. Hemmstoffcharakteristik.....	36
3.3.4. Ionenabhängigkeit.....	39
3.3.5. Regulation.....	45
3.3.5.1. Antagonismus von Auxin und Calmodulin.....	45
3.3.5.2. Reversible Proteinphosphorylierung.....	48
3.4. Nachweis von lipolytischen Enzymen am E.R.	53
3.5. Freisetzung von membrangebundenem Phosphat durch Auxin.....	55
4. Diskussion.....	59
4.1. Die hochaffine Auxinbindungsstelle am endoplasmatischen Retikulum von DC-Zellen.....	59
4.2. Eigenschaften der Protonenpumpe am E.R.	78
4.3. Regulation der Protonenpumpe am E.R. durch reversible Proteinphosphorylierung.....	102

4.4. Eine neue Hypothese zur molekularen Wirkung von Auxin.....	113
4.5. Ausblick.....	131
5. Zusammenfassung.....	133
6. Literaturverzeichnis.....	137
7. Abbildungen und Tabellen.....	175
8. Danksagung.....	253
9. Lebenslauf.....	254

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
cAMP	Adenosin-3':5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP- γ -S	Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
ATPase	Adenosintriphosphatase
BA	Benzoessäure
BIS-TRIS-PROPAN	(1,3-bis[tris(Hydroxymethyl)-methylamino]propan
CaM	Calmodulin
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CPIB	α -(o-Chlorphenoxy)-isobuttersäure
CPZ	Chlorpromazin
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DC-Zellen	in vitro kultivierte Zellen von <i>Daucus carota</i> L.
DCCD	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DES	Diethylstilbesterol
DG	1,2-Diacylglycerol
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)N,N'-tetraessigsäure
E.R.	endoplasmatisches Retikulum
h.E.R.	schwere Membranfraktion des E.R.
l.E.R.	leichte Membranfraktion des E.R.
G.A.	Golgi-Apparat, Dictyosomen
GERL	G.A.-E.R.-Lysosomen-Komplex
cGMP	Guanosin-3':5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IAA	Indol-3-essigsäure

M	Mitochondrien
MM	Molekularmasse
NAA	1-Naphtylessigsäure
NAD	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
NPA	N-1-Naphthylphthalamidsäure
NPPC	p-Nitrophenylphosphorylcholin
NR	Neutralrot
P	Plasmalemma
PA	Phosphatidylsäure
PAA	Phenylelessigsäure
P _i	Orthophosphat
PP _i	Pyrophosphat
PI	Phosphatidylinositol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PKI	Proteinkinaseinhibitor
SITS	4-Acetamino-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure
TFP	Trifluoperazin
TPZ	Triphenylzinnchlorid bzw. Tri-n-propylzinnchlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	Uridin-5'-triphosphat



1. Einleitung

Seit der Beschreibung des Phototropismus der Gramineenkoleoptile von DARWIN (1880) und den späteren grundlegenden Versuchen zur physiologischen Erklärung dieser Reaktion und damit verwandter Wachstumsphänomene durch BOYSEN-JENSEN (1913, 1928), PAÁL (1919), SÜDING (1925) und vor allem WENT (1928) wurde das Wissen über die Beteiligung des dafür verantwortlichen Hormons Auxin in immer neuen Untersuchungen ständig erweitert. Heute stellt die Gramineenkoleoptile sicherlich das phänomenologisch am besten untersuchte Objekt der Hormonphysiologie höherer Pflanzen dar. Jedoch ist die Primärreaktion des Auxins für das Wachstum der Gramineenkoleoptile genauso wenig geklärt wie für alle anderen in späteren Untersuchungen beschriebenen Phänomene der Auxinwirkung auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Pflanzen (THIMANN, 1977). Auch bei allen anderen inzwischen nachgewiesenen Phytohormonen wie Gibberellin, Cytokinin, Abscisinsäure und Ethylen erlauben die umfangreichen Erkenntnisse zur Physiologie dieser Hormone nicht die Erklärung ihrer spezifischen Primärreaktionen. Was sind die Ursachen für die offensichtlichen Schwierigkeiten, die spezifischen Primärreaktionen der Phytohormone, hier im besonderen die des Auxins, aufzuklären?

Die Untersuchungen zur physiologischen Wirkung von Phytohormonen wurden in der Vergangenheit wesentlich von dem Erkenntnisstand der tierischen Hormonphysiologie beeinflusst. Entsprechend wurde zunächst das Konzept der Hormonhypothese übernommen. Dies bedeutete in Anwendung auf die Entwicklungsphysiologie von Pflanzen, daß Phytohormone als begrenzende und damit regulierende endogene Faktoren der Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Pflanzen angesehen wurden. Qualitativ unterschiedliche physiologische Reaktionen wurden als Folge von Konzentrationsänderungen der Phytohormone in der Pflanze erklärt. Doch widersprechen einige für Phytohormone charakteristische Eigenschaften diesem Konzept. Die

Phytohormone weisen nämlich eine im Vergleich zu tierischen Hormonen viel geringere Spezifität in der physiologischen Wirkung auf. Das äußert sich im Phänomen der multiplen Wirkung des Phytohormons, d.h. das Hormon kontrolliert in der Pflanze qualitativ unterschiedliche physiologische Prozesse. Dabei stimuliert das Phytohormon die Prozesse in einem weiten Konzentrationsbereich, der in seinem Umfang bis zu sechs Zehnerpotenzen umfassen kann. Zudem wirken verschiedene Hormone gleichartig auf bestimmte physiologische Prozesse. Schließlich ging der ursprüngliche Hormonbegriff der Hormonhypothese in der Tierphysiologie von einer räumlichen Trennung von Synthese- und Wirkungsort des Hormons im Organismus aus (KARLSON, 1982). In Pflanzen läßt sich eine solche räumliche Trennung von Biosynthese des Phytohormons an einem und von seiner physiologischen Wirkung an einem anderen Ort so deutlich ausgeprägt nicht finden (SEMBDNER et al., 1980). Zusammenfassend stellt sich damit heraus, daß sich mit der Hormonhypothese zwar einige physiologische Wirkungen phänomenologisch beschreiben aber letztlich nicht grundsätzlich im Mechanismus klären lassen.

Seit mehr als einem Jahrzehnt wird als neuer experimenteller Ansatz zur Aufklärung der Primärreaktionen von Phytohormonen die Hormonrezeptorhypothese aus der Tierphysiologie übernommen. Diese Hypothese besagt, daß Hormone nicht als freie Moleküle, sondern nur bei Bindung an eine subzelluläre Struktur, dem Rezeptor, in der Zelle wirken. Für die Entwicklungsphysiologie bedeutet diese Vorstellung einen großen Erkenntnisfortschritt, erklärt sie doch überzeugend die Kompetenz einer Zelle, ein Hormon als Signal zu erkennen und auf das Signal Hormon zu reagieren. Damit ist das Hormon an sich nicht mehr der entscheidende Faktor, sondern die Hormonempfindlichkeit einer Zelle bestimmt, ob das Hormon nur noch als auslösendes Signal durch Bindung an den Rezeptor spezifische molekulare Reaktionen in der Zelle und damit auch übergeordnete physiologische Prozesse einleiten kann (TREWAVAS, 1982).

In unterdessen schon zahlreichen Untersuchungen ließen sich Bindungsstellen für die einzelnen Phytohormone an Membranen oder im Cytosol nachweisen, so daß das Vorkommen spezifischer Hormonrezeptoren auch in der Pflanzenzelle angenommen wird (KENDE & GARDNER, 1976; DODDS & HALL, 1980). Die zu dieser Thematik am weitesten fortgeschrittenen Untersuchungen betreffen vor allem den Nachweis und die Charakterisierung von Auxinbindungsstellen an subzellulären Strukturen der Gramineenkoleoptile, dem klassischen Objekt der Auxinforschung. Aber es ist noch völlig unklar, ob die nachgewiesenen Auxinbindungsstellen tatsächlich die nativen Auxinrezeptoren sind, da bei ihnen die Funktion einer hormonkontrollierten Primärreaktion nicht festgestellt werden konnte (HERTEL, 1981; RUBERY, 1981). Es ist also auch auf der Grundlage der Hormonrezeptorhypothese bisher nicht gelungen, ausgehend von der Bindung des Phytohormons an eine subzelluläre Struktur seine dadurch mögliche molekulare Wirkung, d.h. seine Primärreaktion zu erfassen und mit ihr seine als Phänomen sichtbare physiologische Wirkung auf die Pflanzenzelle zu erklären.

In dieser Situation untersucht die vorliegende Arbeit das zellbiologische Problem der molekularen Wirkung des Phytohormons Auxin. Das biologische Objekt für diese Untersuchung sind DC-Zellen, das sind *in vitro* kultivierte somatische Zellen von *Daucus carota* L.. Diese DC-Zellen, wie auch isolierte Zellen aus anderen höheren Pflanzen der verschiedenen Spezies, sind oft nur bei Zusatz von Auxin im Nährmedium unbegrenzt am Wachstum als Zellkultur zu erhalten. Zu diesem Ergebnis gelangte schon GAUTHERET (1939) in seiner grundlegenden experimentellen Arbeit über die unbegrenzte Kultivierung pflanzlicher Zellen. Seitdem werden Zell- und Gewebekulturen für entwicklungsphysiologische Fragestellungen als besonders geeignete Untersuchungsobjekte eingesetzt, da sich nicht nur die exogenen Faktoren wie Licht, Temperatur, Nährstoffe u.a. gänzlich kontrollieren, sondern vor allem endogene Faktoren wie Hormone sowie korrelative Beziehungen

zwischen Zellen weitgehend ausschalten lassen. Dabei lassen sich in Zell- und Gewebekulturen durch Veränderungen des Hormongehalts in chemisch eindeutig definierten Nährmedien Art und Ablauf der Wachstumsintensität und der Differenzierungsprozesse der Zellen beeinflussen. So reagieren z.B. DC-Zellen auf Auxinentzug im Nährmedium mit der Bildung von somatischen Embryonen (REINERT, 1959) oder bei Erhöhung der Auxinkonzentration im Nährmedium mit einer Verkleinerung des Zellvolumens und einer Beschleunigung der Wachstumsintensität (LLOYD et al., 1980). Die physiologische Wirkung von Auxin ist also auch auf die einzelne DC-Zelle offenbar nicht spezifisch, sondern breit angelegt und hängt von der physiologischen Kompetenz dieser Zelle ab. Dieses Phänomen wurde auch schon von BACKS-HÜSEMANN (1972) bei Untersuchungen über die Kontrolle der Morphogenese in DC-Zellkulturen festgestellt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen über die molekulare Wirkung von Auxin in DC-Zellen basieren auch auf der Hormonrezeptorhypothese, zumal *in vitro* kultivierte Zellen von *Nicotiana tabacum* Auxinbindungsstellen enthalten, für die eine Funktion bisher nicht nachgewiesen werden konnte (LIBBENGA et al., 1982). Die experimentelle Zielsetzung dieser Arbeit ist deshalb die Beantwortung folgender zellbiologischer Fragestellungen:

- 1) Lassen sich Auxinbindungsstellen in DC-Zellen nachweisen?
- 2) Wenn ja, kontrollieren diese Auxinbindungsstellen bestimmte molekulare Reaktionen in DC-Zellen?

Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen beantworten nicht nur diese Fragestellungen, sondern ermöglichen es darüber hinaus, eine Hypothese zur Primärwirkung des Auxins und zu den weitreichenden Folgen für die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Pflanzenzelle zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Bei einem Vergleich der Wirkung bestimmter Chemikalien in biologischen bzw. biochemischen Versuchen treten manchmal geringe firmenspezifische Unterschiede auf. Aus diesem Grund sind die in den Versuchen verwendeten speziellen Chemikalien, Enzymsubstrate und Hemmstoffe, nach Herstellerfirmen geordnet, in der folgenden Auflistung zusammengestellt. Mineralsalze, organische Lösungsmittel und andere Substanzen, die in der Auflistung nicht enthalten sind, wurden in den Qualitäten "zur Analyse", "für biologische Zwecke" oder "reinst" von MERCK, Darmstadt, bezogen.

ATLANTA, Chemie- und Handelsgesellschaft mbH, Heidelberg

4-Acetamino-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure, Dinatriumsalz (SITS)

Triphenylzinnchlorid

Tri-n-propylzinnchlorid

BOEHRINGER Mannheim GmbH, Mannheim

Adenosin-5'-diphosphat, Dinatriumsalz ($\text{Na}_2 \cdot \text{ADP}$)

Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz ($\text{Na}_2 \cdot \text{ATP}$)

Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat), Tetralithiumsalz ($\text{ATP-}\gamma\text{-S}$)

Antimycin A

Calmodulin (CaM) aus Schweinehirn

Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)

Cytidin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz ($\text{Na}_2 \cdot \text{CTP}$)

Cytochrom c

Gramicidin D

Guanosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz ($\text{Na}_2 \cdot \text{GTP}$)

Ionophor A 23187

β -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert, Tetra-
natriumsalz (NADPH)

p- Nitrophenylphosphat, Dinatriumsalz

Oligomycin

Ouabain

Trifluoperazin-Dihydrochlorid (TFP)

Uridin-5'-triphosphat, Trinatriumsalz ($\text{Na}_3 \cdot \text{UTP}$)

Valinomycin

CALBIOCHEM GmbH, Frankfurt a.M.

Polymyxin B

EGA-CHEMIE GmbH & Co. KG, Steinheim

Ammoniumheptamolybdat, Tetrahydrat - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Natriumorthovanadat - Na_3VO_4

MERCK, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO), Lösungsmittel für Szintillations-
messungen

Dinonylphthalat für die Gaschromatographie

Indol-3-essigsäure (IAA)

Tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS)

MERCK-SCHUCHARDT, Hohenbrunn

Dibutylphthalat zur Synthese

SIGMA Chemie GmbH München, Taufkirchen

Acetonitril

Adenosin-5'-diphosphat, vanadatfreies TRIS-Salz (TRIS-ADP)

Adenosin-5'-triphosphat, vanadatfreies TRIS-Salz (TRIS-ATP)

α -(o-Chlorphenoxy)-isobuttersäure (CPIB)

Chlorpromazin (CPZ)

4,4'-Diisothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure, Dinatrium-salz (DIDS)

Dimethylformamid

Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)N,N'-tetraessigsäure (EGTA)

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)

Neutralrot (3-Amino-m-dimethylamino-2-methylphenazinhydrochlorid)

p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC)

Phenyllessigsäure (PAA)

L- α -Phosphatidylsäure, Natriumsalz

Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure), freie Säure (PIPES)

Probenecid

Proteinkinaseinhibitor aus Kaninchenmuskel (PKI)

Proteinkinaseinhibitor, Typ III aus Schweineherz (PKI)

Pyridoxal-5'-phosphat

SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)

Reagenzien für die Phosphatbestimmung nach EIBL & LANDS (1969)

RENOGRAFIN

2.2. Radiochemikalien

Für die Auxinbindung wurden entweder [5(n)-³H]-Indoleessigsäure (0.55 bzw. 1.07 TBq mmol⁻¹) vom Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Service des molécules marquées, Gif-sur-Yvette, Frankreich, oder 1-Naphthyl [1-¹⁴C]essigsäure (1.6 bzw. 2.0 GBq mmol⁻¹) vom Radiochemical Centre Amersham, Großbritannien, eingesetzt.

2.3. Zellkulturen von *Daucus carota* L.

2.3.1. Isolierung und Kultivierung von Zellsuspensionen

Alle Experimente wurden mit Zellsuspensionskulturen von *Daucus carota* L. durchgeführt. Der verwendete Zellstamm war aus der Wurzel einer Karotte der Kulturvarietät "Rote Riesen" am 18.01.1977 wie folgt isoliert und anschließend immer unter sterilen Bedingungen kultiviert worden. Nach der Oberflächensterilisierung der geschälten Rübe in verdünnter Natriumhypochloritlösung (Haushaltsreiniger ACE[®])

wurden Explantate isoliert, die Gewebe des Kambiums, des Xylems und der sekundären Rinde enthielten (GAUTHERET, 1959). Diese Explantate wurden auf 10 ml Agar (8 g l^{-1}) in Kulturröhrchen aus Glas (Durchmesser 2.2 cm, Länge 15 cm) gegeben, im Dauerdunkel bei $+28 \pm 1^\circ\text{C}$ kultiviert und alle vier Wochen auf ein neues Nährmedium übertragen. Nach 16 Wochen wurden sichtbar gut wachsende Kalli mit dem Spatel vom festen Nährmedium entnommen und in einem 250 ml-Weithalserlenmeyerkolben mit 50 ml flüssiger Nährlösung überführt. Nach Verschließen der Kulturkolben mit Aluminiumfolie (Dicke $15\text{ }\mu\text{m}$) wurden diese Kulturen auf Horizontalschüttelmaschinen bei 70 Umdrehungen pro Minute gegeben und unter den zuvor genannten Bedingungen kultiviert. Nach zwei Wochen konnten Einzelzellen sowie wenigzellige Aggregate von den nicht dissoziierten Gewebestücken durch Filtrieren mit Gaze der Maschenweite $200\text{ }\mu\text{m}$ in genügend großer Anzahl getrennt werden. Dieses Filtrat war das Ausgangsmaterial für die Anlage der Suspensionskulturen. Hierzu wurden 10 ml Filtrat in 50 ml Nährlösung pipettiert und unter den zuvor beschriebenen Bedingungen kultiviert. Der Austausch der Nährlösung erfolgte immer nach einer Woche durch steriles Pipettieren von 10 ml Zellsuspension in 50 ml neue Nährlösung an einer sterilen Werkbank. Sowohl die Stammkulturen auf Agar als auch die Suspensionskulturen wurden auf bzw. in dem synthetischen Nährmedium "MS" gehalten (REINERT et al., 1966), das die Salze nach MURASHIGE & SKOOG (1962), die organischen Zusätze nach WHITE (1954) sowie 20 g l^{-1} Saccharose als Kohlenstoffquelle enthielt. Das Nährmedium wurde bei den Agarkulturen mit $5 \times 10^{-5}\text{ g l}^{-1}$ und bei den Suspensionskulturen mit $1 \times 10^{-3}\text{ g l}^{-1}$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) ergänzt. Diese Nährmedien wurden mit Natronlauge auf pH 5.5 eingestellt und 20 min bei einem Druck von 203 kPa und $+120^\circ\text{C}$ im Autoklaven sterilisiert.

2.3.2. Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht

Täglich wurden an der sterilen Werkbank mit einer Kolbenhubpipette zwei Proben à 1 ml der Suspensionskultur entnommen. Hierzu wurde die Pipette mit durch Ethanol befeuchteten Papiertüchern abgewischt und nach Verdunsten des Ethanols schnell einmal durch die Flamme des Alkoholbrenners gezogen. Die an der Oberfläche sterile Pipette wurde mit einer sterilen Pipettenspitze versehen, die 1 ml-Proben aus der Suspensionskultur entnommen und in je ein 15 ml-Reagenzglas pipettiert. Nach der Probenentnahme wurden zum Volumenausgleich 2 ml steriler Nährlösung hinzupipettiert. Anschließend wurde die Öffnung des Kulturkolbens abgeflammt, mit einem Blatt steriler Aluminiumfolie verschlossen und die Suspensionskultur auf die Schüttelmaschine zurückgestellt. Die entnommenen Proben wurden im Labor zur Frisch- und Trockengewichtsbestimmung verwendet. Hierzu wurde zunächst ein trockenes Glasfaserfilter des Typs WHATMAN GF/A an der Analysenwaage ausgewogen, bevor es auf einem Filtrationsgerät 60 s unter Vakuum mit 5 ml Wasser angefeuchtet wurde. Nach Wägung des feuchten Filters an der Analysenwaage wurden die Zellen der 1 ml-Probe unter Verwendung von 4 ml Wasser quantitativ auf dem zuvor befeuchteten Filter mit dem Filtrationsgerät unter Vakuum gesammelt. Mit der Analysenwaage ließ sich das Gewicht des Filters mit den Zellen bestimmen und aus der Gewichts Differenz der beiden letzten Wägungen das Frischgewicht der Zellen in der Probe ermitteln. Nach ca. 24 h Trocknen der Zellen auf dem Filter im Wärmeschrank bei +60°C konnte das Trockengewicht der Zellen bestimmt werden.

2.4. Präparation von subzellulären Membranfraktionen aus DC-Zellen

Alle Aufarbeitungsschritte für die Präparation von subzellulären Membranfraktionen fanden im Kühlraum bei +4°C mit ebenso kalten Pufferlösungen und anderen Medien statt. Die

Zentrifugationen wurden bei +2°C in der Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge vom Typ BECKMAN J21B mit den Festwinkelrotoren BECKMAN JA-20 bzw. JA-21 und in der Ultrazentrifuge vom Typ SORVALL OTD-2 mit dem Festwinkelrotor BECKMAN 42.1 und den Schwingbecherrotoren BECKMAN SW 25.1 und SORVALL AH 627 durchgeführt.

2.4.1. Mikrosomale Membranfraktion

Die Präparation der mikrosomalen Membranfraktionen aus DC-Zellen erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift, die von RAY et al. (1977) für die Isolierung von mikrosomalen Membranen aus Koleoptilzellen von *Zea mays* verwendet wurde.

DC-Zellen (100 g Frischgewicht) wurden mit 100 ml Puffer der Zusammensetzung 50 mmol l⁻¹ TRIS-HCl, 250 mmol l⁻¹ Saccharose, 1 mmol l⁻¹ EDTA und 0.1 mmol l⁻¹ MgCl₂ bei pH 8.0 versetzt und mit 100 g Seesand 15 min im eiskalten Mörser homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 min bei 2 000 xg (JA-20) zur Entfernung von Seesand, intakten Zellen und Zellwänden zentrifugiert. Zellkerne und Mitochondrien konnten durch 10 min Zentrifugation bei 8 000 xg (JA-20) quantitativ entfernt werden. Anschließend wurde der 8 000 xg-Überstand 1 h bei 90 000 xg (42.1) zentrifugiert. Das 90 000 xg-Sediment wurde in Puffer mit 25 mmol l⁻¹ PIPES-NaOH, 250 mmol l⁻¹ Saccharose und 0.5 mmol l⁻¹ Mg Cl₂ bei pH 6.0 resuspendiert und nochmals 1 h bei 90 000 xg (42.1) zentrifugiert. Das Sediment wurde in insgesamt 20 ml Puffer der Zusammensetzung 25 mmol l⁻¹ PIPES-NaOH, 250 mmol l⁻¹ Saccharose und 5 mmol l⁻¹ Mg Cl₂ bei pH 5.5 aufgenommen, mit einem Glaspotter homogenisiert und anschließend zur Aufbewahrung im flüssigen Stickstoff in 20 ml-Szintillationsgefäßen aus Polyethylen aufbewahrt.

2.4.2. Membranfraktionen mit definierter Schwebedichte

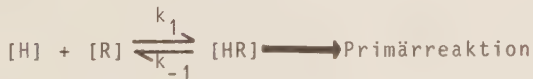
Die Methode, mit der BOSS & RUESINK (1979) isolierte Membranen aus Karottenprotoplasten im diskontinuierlichen RENOGRAPHIN-Dichtegradienten aufgetrennt haben, wurde übernommen, um Membranfraktionen mit definierter Schwebedichte aus DC-Zellen zu präparieren. Zu diesem Zweck wurden 100 g (Frischgewicht) DC-Zellen mit 100 g Seesand und 100 ml Puffer (50 mmol l^{-1} TRIS-HCl, 250 mmol l^{-1} Saccharose, 10 mmol l^{-1} KCl, 1 mmol l^{-1} EDTA, 0.1 mmol l^{-1} Mg Cl_2 , pH 8.0) im eiskalten Mörser 15 min homogenisiert. Durch zweimalige Zentrifugation à 10 min bei $2\,000 \times g$ (JA-20) ließen sich Zelltrümmer und Seesand aus dem Homogenisat entfernen. Der $2\,000 \times g$ -Überstand wurde direkt auf den diskontinuierlichen RENOGRAPHIN-Dichtegradienten gegeben und in 2 h durch Zentrifugation bei $120\,000 \times g$ (AH 627) in Membranfraktionen definierter Schwebedichte aufgetrennt. Dabei konnten unterschiedliche Membranfraktionen im präparativen Maßstab nur gut getrennt werden, wenn der diskontinuierliche Dichtegradient nicht mehr als drei Dichtestufen enthielt. Folglich variierte die Zusammensetzung des Dichtegradienten entsprechend der Zielsetzung, bestimmte Membranfraktionen anzureichern. Die Zusammensetzung der Dichtegradienten für die Isolierung definierter Membranfraktionen ist in Tabelle 2 und in der Legende zu Abbildung 12 angegeben. Für die Gradienten wurde RENOGRAPHIN mit TRIS bzw. NaOH gelöst, auf pH 7.5 eingestellt und mit 10 mmol l^{-1} KCl, 1 mmol l^{-1} EDTA und 0.1 mmol l^{-1} Mg Cl_2 versehen. RENOGRAPHIN-Lösungen der Konzentrationen 100, 180, 230, 270 und 370 g l^{-1} und entsprechender Dichten von 1.049, 1.093, 1.122, 1.146 und 1.210 g cm^{-3} wurden hergestellt. Nach der Zentrifugation der RENOGRAPHIN-Gradienten erfolgte die Fraktionierung der aufgetrennten Membranen mittels eines Dichtegradientenfraktionators des Typs ISCO Model 185, indem der Gradient mit einer Saccharoselösung (856 g l^{-1}) unterschichtet und bei einer Pumpgeschwindigkeit von 3 ml min^{-1} aus dem Röhrchen geschoben wurde. Die Position der Membranen im Gradienten

ließ sich als Trübung bei $\lambda = 546 \text{ nm}$ mit einem Durchflußphotometer des Typs ISCO UA-5 messen, und entsprechende Bereiche wurden fraktioniert. Isolierte Membranfraktionen wurden mit dem dreifachen Volumen Puffer (25 mmol l^{-1} TRIS-HCl, 10 mmol l^{-1} KCl, 1 mmol l^{-1} EDTA, 0.1 mmol l^{-1} Mg Cl_2 , pH 7.5) verdünnt und die Membranen 1 h durch Zentrifugation bei $177\,000 \text{ xg}$ (42.1) pelletiert. Nach der Resuspension des Sediments in Puffer (25 mmol l^{-1} PIPES-NaOH, 250 mmol l^{-1} Saccharose, pH 7.0) wurde 1 h bei $90\,000 \text{ xg}$ (42.1) zentrifugiert. Die gewaschenen Membranen wurden in Puffer (25 mmol l^{-1} PIPES-NaOH, 250 mmol l^{-1} Saccharose, pH 6.5) aufgenommen, nochmals wie zuvor zentrifugiert, danach im letztgenannten Puffer resuspendiert und nach Abfüllung in Szintillationsgefäßen im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

2.5. Auxinbindungstests

2.5.1. Prinzip des Hormonbindungstests

Die theoretische Grundlage für den experimentellen Ansatz zur Aufklärung der Primärreaktion des Auxins in DC-Zellen war die Hormonrezeptorhypothese. Die wesentliche Aussage dieser Hypothese lautet: Das Hormon bindet an einen Rezeptor, und der Hormonrezeptorkomplex löst die Primärreaktion aus. Diese Aussage läßt sich auch als Gleichung wie folgt formulieren:



Dabei stehen die Symbole für die Konzentrationsangaben des Hormons [H], des Rezeptors [R] und des Hormonrezeptorkomplexes [HR] im Zustand des Reaktionsgleichgewichts. k_1 und k_{-1} bezeichnen die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation bzw. Dissoziation des Hormonrezeptorkomplexes. Aus der Art des Verhältnisses der beiden Geschwindigkeitskonstanten

k_1 und k_{-1} zueinander werden die Affinitäts- (K_A) und die Dissoziationskonstante (K_D) des Hormonrezeptorkomplexes wie folgt definiert:

$$K_A = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[HR]}{[H] [R]}$$

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[H] [R]}{[HR]}$$

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Hormonrezeptorkomplexes ergibt sich dann aus der Beziehung:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}}$$

Der einfachste methodische Ansatz, diese Kenngrößen experimentell zu bestimmen, ist die Anwendung von radioaktiv markierten Hormonsubstanzen. Dazu wird im Bindungsexperiment zu Zellen oder einer subzellulären Fraktion ein Aliquot mit relativ niedriger Konzentration an radioaktiv markiertem Hormon mit steigenden Konzentrationen von unmarkiertem Hormon versetzt. Nach der Einstellung des Reaktionsgleichgewichts werden die am Rezeptor gebundenen von den freien, ungebundenen Hormonmolekülen getrennt. Dafür sind die Zentrifugation, Ultrafiltration, Gelpermeationschromatographie oder Gleichgewichtsdialyse geeignete Methoden (CUATRECASAS & HOLLENBERG, 1976). Die am Rezeptor gebundene Radioaktivität wird gemessen und die Meßwerte graphisch nach SCATCHARD (1949) zur Ermittlung der genannten Kenngrößen ausgewertet.

2.5.2. Zentrifugation

Die Fähigkeit von aus DC-Zellen isolierten Membranfraktionen Auxin zu binden, wurde mit dem Sedimentationstest entweder nach LEMBI et al. (1971) oder nach GLIEMANN et al. (1972)

mit Zusatz einer Ölphase überprüft. Die erste Methode wird in dieser Arbeit als Normalsedimentation, die zweite als Ölphasensedimentation bezeichnet. Beide Arten des Auxinbindungstests erfolgten in Miniszintillationsgefäßen des Typs BECKMAN BIOVIAL, so daß alle Einzelschritte des Auxinbindungsversuchs wie Auxinbindungsreaktion, Zentrifugation der Membranen, Extraktion des gebundenen Auxins und Messung der Radioaktivität des extrahierten Auxins in demselben Gefäß durchgeführt werden konnten. Der Inkubationsansatz für die Auxinbindungsreaktion enthielt in einem Endvolumen von 2 ml die Membranen, radioaktiv markiertes Auxin und, wenn erforderlich, unmarkiertes Auxin im Überschuß. Die Einzelheiten der Zusammensetzung der verschiedenen Bindungsversuche sowie der Inkubationsbedingungen werden in den Legenden der Abbildungen bzw. im Abschnitt "Versuche und Ergebnisse" genannt. Die Auxinbindungsreaktion wurde durch Zugabe der Membranen gestartet und nach der Inkubation durch Zentrifugation von 20 min bei 50 000 xg (JA-21) und + 2°C beendet. Im Falle der Ölphasensedimentation wurde vor der Zentrifugation ein 0.5 ml-Aliquot eines Gemischs von Dibutylphthalat und Dinonylphthalat im Volumenverhältnis 9:4 mit der Dichte $\rho = 1.028 \text{ g cm}^{-3}$ hinzupipettiert. Nach Abkippen des Überstands, bei der Ölphasensedimentation einschließlich der Ölphase, standen die Gefäße zum Abtropfen der Restflüssigkeit an der Innenwandung mit der Öffnung nach unten auf Papiertüchern, bevor jedes Gefäß mit einem Papiertuch vorsichtig ausgewischt und mit 0.5 ml Ethanol zur Auxinextraktion versetzt wurde. Nach 16 h wurde die Radioaktivität des ethanolschen Extraktes durch Zugabe von 4 ml Szintillatorlösung (5 g l^{-1} 2,5-Diphenyloxazol und 0.5 g l^{-1} 2,2'-p-Phenylen bis(4-methyl-5-phenyloxazol) in Toluol) im Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.5.3. Filtration

Die Eigenschaft isolierter subzellulärer Membranen aus DC-Zellen Auxin zu binden, wurde auch mit der Filtrationsmethode überprüft. Hierzu wurden 1 ml-Aliquote eines Inkubationsansatzes mit Membranen, radioaktivem Auxin und, wenn erforderlich, mit unmarkiertem Auxin im Überschuß auf in einem Vielfachfiltrationsgerät des Typs Amicon VFM-1 eingelegte Membranfilter pipettiert. Bei vorhandenem Unterdruck am Filtrationsgerät sedimentierten die Membranen auf der Filteroberfläche bei gleichzeitigem Abfluß der Flüssigkeit durch die Membranfilter in den Sammelbehälter. Zur Reduzierung von unspezifisch, d.h. an die Membranfilter gebundenen Auxins wurden die Filter mit 10 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen. Die anschließende Extraktion des membrangebundenen Auxins erfolgte durch 16 h Inkubation der gewaschenen Membranfilter mit 2 ml Ethanol in einem 20 ml Szintillationsgefäß. Nach Zugabe von 8 ml Szintillatorlösung (5 g l^{-1} 2,5-Diphenyloxazol und 0.5 g l^{-1} 2,2'-p-Phenylbis (4-methyl-5-phenyloxazol)in Toluol) konnte die Radioaktivität der Probe im Flüssigszintillationszähler bestimmt werden. Für die Filtrationsversuche wurden Membranfilter aus Zelluloseestern (Amicon Diapor mit $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser), aus Polycarbonat (BIORAD UNIPOR mit $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser) und aus Glasfaser (WHATMAN GF/F mit $0.7 \text{ }\mu\text{m}$ Porendurchmesser) eingesetzt.

2.5.4. Gleichgewichtsdialyse

Die Überprüfung der Auxinbindungseigenschaft von isolierten Membranfraktionen aus DC-Zellen erfolgte auch mit der Methode der Gleichgewichtsdialyse. Dabei wurde ein Gleichgewichtsdialysator des Typs DIANORM mit DIACHEMA-Membranen aus Cellulosehydrat der Fa. BACHOFER (Reutlingen) eingesetzt. Nach Vorbehandlung der Dialysierzellen aus Teflon sowie der Dialysiermembranen entsprechend der Vorschrift

des Herstellers wurde eine Dialysierzellenhälfte mit der Membransuspension und die andere mit einer Lösung von radioaktiv markiertem Auxin und, wenn erforderlich, von unmarkiertem Auxin im Überschuß gefüllt. Nach 4 h wurde in der Dialysierzelle das Konzentrationsgleichgewicht von ungebundenem Auxin erreicht, aus jeder Zellenhälfte eine 800 µl-Probe entnommen und mit 8 ml Szintillatorlösung (QUICKSZINT 402 der Fa. ZINSSER, Frankfurt a. M.) in 20 ml-Szintillationsgefäßen gemischt. Die Radioaktivität der Probe wurde im Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.6. Flüssigszintillationsmessungen

Die Radioaktivität von [^3H]- oder [^{14}C]-markierten Proben wurde in 4 ml- bzw. 20 ml-Zählgefäßen mit einem Flüssigszintillationszähler des Typs BECKMAN LS 7000 gemessen. Der Quenchgrad der einzelnen Proben wurde durch Aufnahme einer Quenchkorrekturkurve über den sogenannten H #- Wert bestimmt und entsprechend bei der Umrechnung von Meßimpulsen (cpm) in tatsächliche Impulse (dpm) berücksichtigt.

2.7. Enzymatische Tests

2.7.1. Protonenpumpe

Die Eigenschaft der energieabhängigen Protonentranslokation in das Vesikelvolumen von Membranen, die aus DC-Zellen isoliert und durch Zentrifugation im diskontinuierlichen RENO-GRAFIN-Dichtegradienten angereichert wurden, ließ sich mit der photometrischen Methode von HAGER et al. (1980) überprüfen. Bei dieser Methode wird der energieabhängige Aufbau eines pH-Gradienten in Membranvesikeln über die Absorptionsänderung im Differenzspektrum des pH-Indikators Neutralrot gemessen. Das Prinzip sowie die Einzelheiten der Zusammensetzung der Inkubationsansätze und die Inkubationsbedingungen der verschiedenen Versuchsansätze werden im Ab-

schnitt "Versuche und Ergebnisse" bzw. in den Legenden der Abbildungen und Tabellen beschrieben. Für den photometrischen Test enthielten zwei Glasküvetten (Volumen 1.5 ml; Schichtdicke 1 cm) als parallele Inkubationsansätze in einem Endvolumen von 1ml die Membranen in einem gepufferten Neutralrotmedium definierter Ionenzusammensetzung sowie, wenn erforderlich, aliquote Mengen von Zusätzen (Calmodulin, Auxin, Hemmstoffe, Ionophore u.a.). Nach 5 min Vorkinkubation der Reaktionsansätze zur Temperaturäquilibration in einem temperierten Küvettenhalter wurde die Reaktion entweder durch gleichzeitige Zugabe von ADP in die Vergleichs- und ATP in die Meßküvette oder bei einem Vielfachansatz von Meßküvetten im 15 sec-Takt des Küvettenwechslers gestartet. Der Reaktionsverlauf ließ sich durch Messung der Absorptionsänderungen in einem Zweistrahlphotometer des Typs ZEISS DM 4 entweder über die Aufnahme von Differenzspektren im Bereich zwischen $\lambda = 350$ nm und $\lambda = 700$ nm oder im Absorptionsmaximum des protonierten Neutralrotmoleküls bei $\lambda = 535$ nm verfolgen. Die Meßwerte wurden mit einem Schreiber SERVOGOR S kontinuierlich aufgezeichnet oder mit einem Drucker im Abstand von 60 s festgehalten.

2.7.2. Phospholipase C (EC 3.1.4.3 bzw. 3.1.4.10)

Die Aktivität der membrangebundenen Phospholipase C am E.R. von DC-Zellen wurde in Anlehnung an die Methode von KURIOKA & MATSUDA (1976) über die Hydrolyse des künstlichen und wasserlöslichen Substrats p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC) nachgewiesen. Um eine Hydrolyse von NPPC durch endogene unspezifische Phosphatasen (SRIVASTAVA et al., 1982) zu verhindern, wurde die Enzymreaktion in Anwesenheit von Natriumorthovanadat (1 mmol l^{-1}) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Hydrolyse von NPPC ausschließlich durch die Phospholipase C entspre-

chend der Reaktion:



Als Enzymaktivität wurde die Freisetzung von p-Nitrophenol bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ photometrisch bestimmt. Der Versuchsansatz (1 ml) enthielt $4 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Mg SO}_4$, $50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KCl}$, $20 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NPPC}$, $20 \text{ mmol l}^{-1} \text{ PIPES-NaOH}$ (pH 6.5) und $250 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Saccharose}$. Sonstige Zusätze und die Inkubationsbedingungen für die Enzymreaktion werden im Abschnitt "Versuche und Ergebnisse" bzw. in den Legenden der Abbildungen beschrieben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der isolierten Membranen des E.R. gestartet und nach der Inkubation durch Alkalisierung mit $200 \mu\text{l NaOH}$ (100 mmol l^{-1}) im Eisbad gestoppt. Vor der photometrischen Messung wurden die Membranen durch Zentrifugation (20 min bei 50 000 xg im Festwinkelrotor JA-21) sedimentiert.

2.7.3. Phospholipase D (EC 3.1.4.4)

Nach der Methode von GUPTA & WOLD (1980) ließ sich die Aktivität der membrangebundenen Phospholipase D am E.R. von DC-Zellen über die Hydrolyse des künstlichen und wasserlöslichen Substrats p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC) bestimmen. Das Enzym führt dabei folgende Reaktion durch:



Im Gegensatz zu der Untersuchung von GUPTA & WOLD (1980) an einer löslichen Phospholipase D war die Zugabe einer sauren Phosphatase zum Versuchsansatz nicht notwendig, da eine endogene, membrangebundene Phosphatase am E.R. p-Nitrophenol aus p-Nitrophenylphosphat freisetzte. Als

Maß für die enzymatische Hydrolyse von NPPC wurde die Freisetzung von p-Nitrophenol photometrisch bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ bestimmt. Der Versuchsansatz für die Phospholipase D entsprach in der Zusammensetzung dem der Phospholipase C bis auf die Ausnahme, daß ein Hemmstoff für Phosphatasen nicht zugesetzt wurde. Auch die weitere Versuchsdurchführung, d.h. Starten, Stoppen, Zentrifugation und photometrische Messung erfolgte nach der für die Phospholipase C angegebenen Methodik. Einzelheiten zu den verschiedenen Versuchsansätzen der Phospholipase D werden im Abschnitt "Versuche und Ergebnisse" bzw. in den Legenden der Abbildungen beschrieben.

2.7.4. Phosphatidylsäurephosphatase (EC 3.1.3.4)

Die Aktivität der membrangebundenen Phosphatidylsäurephosphatase am E.R. von DC-Zellen wurde in Anlehnung an die Methode von SCHERER & MORRÉ (1978) über die Bestimmung des freigesetzten Orthophosphats nachgewiesen. Das Enzym baut Phosphatidylsäure zu Diacylglycerol und Orthophosphat ab. Der Versuchsansatz (250 μl) enthielt ein Aliquot von isolierten Membranen des E.R. in 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , 50 mmol l^{-1} KCl, 250 mmol l^{-1} Saccharose und 20 mmol l^{-1} PIPES-NaOH (pH 6.5). Weitere Zusätze werden im Abschnitt "Versuche und Ergebnisse" genannt. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von Phosphatidylsäure (Endkonzentration im Versuchsansatz 2 mmol l^{-1}) gestartet und nach einer Inkubation von 60 min bei $+25^\circ\text{C}$ durch Ansäuerung mit 250 μl Trichloressigsäure (100 g l^{-1}) im Eisbad gestoppt. Die Membranen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 4 000 xg im Festwinkelrotor JA-21) sedimentiert und ein Aliquot des Oberstands für die Phosphatbestimmung verwendet.

2.7.5. NADPH-Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.2.3)

Die Aktivität der membrangebundenen NADPH-Cytochrom c-Reduktase an den isolierten Membranen des E.R. aus DC-Zellen wurde mit der Methode von HODGES & LEONARD (1974) über die Reduktion von Cytochrom c photometrisch bestimmt. Der Versuchsansatz enthielt ein Aliquot der Membranfraktion des E.R. sowie $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Cytochrom c in Phosphatpuffer ($50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5). Einige Versuchsansätze enthielten zusätzlich $3 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KCN}$ oder $43 \mu\text{gml}^{-1}$ Antimycin A. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von NADPH (Endkonzentration im Versuchsansatz $170 \mu\text{mol l}^{-1}$) gestartet und am Photometer bei $\lambda = 550 \text{ nm}$ gemessen.

2.8. Freisetzung von membrangebundenem Phosphat

Isolierte Membranen des E.R. aus DC-Zellen wurden in einem Versuchsansatz (1ml) mit $4 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KCl}$, $20 \text{ mmol l}^{-1} \text{ PIPES-NaOH}$ (pH 6.5) und 250 mmol l^{-1} Saccharose in An- und Abwesenheit von Auxin 60 min bei $+25^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad durch Zugabe von $250 \mu\text{l}$ Trichloressigsäure (250 g l^{-1}) gestoppt, die Membranen durch Zentrifugation (10 min bei $4\,000 \text{ xg}$ im Festwinkelrotor JA-21) sedimentiert und 1 ml des Überstands für die Phosphatbestimmung verwendet.

2.9. Phosphatbestimmung

Anorganisches Phosphat wurde nach der photometrischen Methode von EIBL & LANDS (1969) in einem Mikroassay ($1200 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen) unter der Verwendung von Phosphatbestimmungsreagenzien der Fa. SERVA, Heidelberg, bestimmt. Alle Arbeitsschritte der Phosphatbestimmung wurden in mit entionisiertem Wasser gewaschenen Miniszintillationsgefäßen des Typs BECKMANN BIOVIAL durchgeführt.

2.10. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der photometrischen Methode von BRADFORD (1976) in einem Mikroassay (2500 µl Gesamtvolumen) unter der Verwendung von Reagenzien der Fa. BIORAD-Laboratories, München, bestimmt.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. Auxinbindung an mikrosomalen Membranen

3.1.1. Methodik und Nachweis

Bei höheren Pflanzen verschiedener Spezies konnten zahlreiche Autoren *in vitro* hochaffine Auxinbindungsstellen vor allem an subzellulären Membranfraktionen aber auch an isolierten Proteinen aus dem Cytosol nachweisen (RUBERY, 1981). Folglich war, entsprechend den Aussagen der Hormonrezeptorhypothese, die Überprüfung von isolierten subzellulären Membranfraktionen aus DC-Zellen auf das Vorkommen von Auxinbindungsstellen der erste Schritt zu einer möglichen Aufklärung der molekularen Wirkung von Auxin in diesen Zellen. Hierzu wurde durch differentielle Zentrifugation des Homogenisats von DC-Zellen bei 90 000 xg eine Fraktion von mikrosomalen Membranen präpariert, die bei isopyknischer Zentrifugation im Saccharosedichtegradienten als einheitliche Bande bei einer Schwebedichte von $\rho = 1.180 \text{ g cm}^{-3}$ sedimentierte (Abb. 1a). Auch die Auftrennung der 90 000 xg-Membranfraktion im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten zeigte nur eine äußerst geringe Kontamination der bei der Dichtestufe von $\rho = 1.210 \text{ g cm}^{-3}$ angereicherten mikrosomalen Membranen durch eine Membranfraktion bei der Dichtestufe $\rho = 1.157 \text{ g cm}^{-3}$ (Abb. 1b). Diese Fraktion von mikrosomalen Membranen wurde innerhalb eines Kulturzyklus von 8 Tagen an jedem Kulturtage aus DC-Zellen isoliert und hinsichtlich ihrer möglichen Eigenschaft, Auxin zu binden, mit der Methodik des Sedimentationstests nach GLIEMANN et al. (1972) untersucht. Dabei stellte es sich heraus, daß die Gesamtauxinbindungsaktivität der mikrosomalen Membranen im Verlauf eines Kulturzyklus der DC-Zellen moduliert (Abb. 2). Nach Übertragung der DC-Zellen in ein frisches Nährmedium nimmt die Auxinbindungsaktivität der mikrosomalen Membranen

nen zunächst kontinuierlich zu, erreicht am 4. Kulturtage ein Maximum und geht dann kontinuierlich auf die Anfangsaktivität zurück. Weiterhin fällt eine zeitliche Phasenverschiebung von Auxinbindungsaktivität und Wachstumsintensität, gemessen als Frischgewichtszunahme der DC-Zellen, auf. Die maximale Auxinbindung tritt vor Beginn der stärksten Wachstumsphase auf, und, während das Wachstum noch stimuliert wird, nimmt die Auxinbindung schon wieder ab. Entsprechend diesem Versuchsergebnis wurden für die weitere Charakterisierung der Auxinbindung die mikrosomalen Membranen aus DC-Zellen von 4-5 Tage alten Suspensionskulturen präpariert.

Geht die festgestellte Eigenschaft der mikrosomalen Membranen, Auxin zu binden, auf das Vorkommen einer endlichen Anzahl diskreter Bindungsstellen oder auf die kontinuierliche Löslichkeit von Auxin in der Membran zurück? Zur Beantwortung dieser Frage wurden entsprechend der Hormonrezeptorhypothese Kompetitionsexperimente durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß die kompetitive Auxinbindung nur mit der Ölphasensedimentation nach GLIEMANN et al. (1972) aber nicht mit der in der Literatur üblichen Normalsedimentation nach LEMBI et al. (1971) sowie den Methoden der Gleichgewichtsdialyse oder der Filtration nachzuweisen war. Zudem gelang der Nachweis nur bei Verwendung von [^3H]-IAA mit einer hohen spezifischen Radioaktivität (0.55 bzw. $1.07 \text{ TBq mmol}^{-1}$) aber nicht mit [^{14}C]-NAA mit einer geringeren spezifischen Radioaktivität (1.6 bzw. $2.0 \text{ GBq mmol}^{-1}$). Im Bindungstest geht bei geringer Konzentration von [^3H]-IAA ($< 5 \text{ nmol l}^{-1}$) mit zunehmender Konzentration an unmarkierter IAA ($< 100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) die Radioaktivität von membrangebundenem Auxin auf einen Endwert zurück (Abb. 3a). Diese Kompetition von radioaktiv markiertem mit unmarkiertem Auxin um die Hormonbindung bedeutet, daß ein Anteil der Auxinbindungsaktivität der mikro-

somalen Membranen abzusättigen ist, und diese Membranen eine begrenzte Anzahl von diskreten Auxinbindungsstellen enthalten. Die Auftragung der Bindungsdaten im SCATCHARD-Plot ergibt eine hyperbolische Kurve (Abb. 3b). In dem gezeigten Fall läßt sich bei der graphischen Auswertung des steilen Kurvenastes durch Anlegen einer Asymptoten die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen mit 2 pmol g^{-1} Frischgewicht DC-Zellen und ihre Dissoziationskonstante mit 280 nmol l^{-1} bestimmen. Unter der Berücksichtigung, daß 1 g Frischgewicht DC-Zellen ca. 3×10^7 Einzelzellen enthalten (WINTER, 1975), ergibt sich eine Häufigkeit von 40 000 Auxinbindungsstellen pro DC-Zelle. Bei dieser Größenordnung der Dissoziationskonstanten und der Anzahl von Bindungsstellen wird es erklärbar, daß die kompetitive Auxinbindung nur mit der spezifisch höher radioaktiv markierten [^3H]-IAA aber nicht mit [^{14}C]-NAA nachzuweisen ist. Der flache Kurvenast im SCATCHARD-Plot deutet, entsprechend der in der Literatur üblichen Interpretation (RUBERY, 1981), auf eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Auxinbindungsstellen mit sehr geringer Affinität, d.h. auf unspezifische Auxinbindung hin.

3.1.2. Phänomen und Eigenschaften der ethanol sensitiven Auxinbindung

Die chemische Struktur, aromatisches Ringsystem mit einer Seitenkette, die eine protonendissoziierende Gruppe (oft Carboxylgruppe) trägt, kennzeichnet Auxin als amphipathische Substanz, d.h. als Molekül mit hydrophoben als auch hydrophilen Eigenschaften. Dies bedeutet, daß Auxin als Ligand mit apolaren als auch polaren Gruppen eines Rezeptormoleküls in Wechselwirkung treten kann. Zur näheren Charakterisierung dieser Wechselwirkung von Auxin mit der in der mikrosomalen Membran von DC-Zellen lokalisierten Bindungsstelle wurde die Auxinbindung mit der Methode

der Ölphasensedimentation unter verschiedenen physikochemischen Bedingungen getestet. Für diese Versuche wurde [^{14}C]-NAA in einem Konzentrationsbereich von 200-500 nmol l^{-1} eingesetzt, so daß über 50 % der hochaffinen Auxinbindungsstellen von dem radioaktiv markierten Hormon besetzt waren (s. Abb. 3a). Diese hochaffine Auxinbindung reagiert äußerst empfindlich auf geringe Konzentrationen von bestimmten organischen Lösungsmitteln, die üblicherweise bei Konkurrenzexperimenten eingesetzt werden, um in kleinen Volumina dieser Lösungsmittel hohe Konzentrationen an unmarkiertem Auxin in den Bindungstest einzubringen. Organische Lösungsmittel mit einer relativ niedrigen Dielektrizitätskonstanten wie Ethanol ($\epsilon = 24.3$), Acetonitril ($\epsilon = 37.5$) und Dimethylformamid ($\epsilon = 37.6$) reduzieren selbst bei einem niedrigen Volumenverhältnis von 0.01 die Auxinbindung bzw. bei ihrer Anwesenheit geht die Membraneigenschaft der hochaffinen Auxinbindung verloren. Nur bei der Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) mit $\epsilon = 46.3$ wird die Auxinbindung nicht beeinflusst (Tab. 1). Entsprechend läßt sich die kompetitive und hochaffine Auxinbindung nur bei Einbringung des unmarkierten Auxins in den Bindungstest mittels DMSO nachweisen (s. Abb. 3).

Die Bindungseigenschaft der mikrosomalen Membranen aus DC-Zellen ging mit zunehmender Ethanolkonzentration im Bindungstest kontinuierlich zurück. Dabei fällt es auf, daß eine Ethanolkonzentration von 1 mmol l^{-1} schon zu einer merklichen Reduzierung der Auxinbindung führt und daß diese Ethanolwirkung bei einer Inkubationszeit von < 1 min und bei einer Temperatur von $+2^\circ\text{C}$ auftritt (Abb. 4). Diese ethanol-sensitive Auxinbindung war wie die kompetitive Auxinbindung nur mit der Methode der Ölphasensedimentation nachzuweisen und in ihrem Ausmaß direkt proportional zu der im Bindungstest eingesetzten Konzentration an mikrosomalen Membranen (Abb. 5). Bei den zuvor

genannten Bedingungen, Inkubationszeit < 1 min und Inkubationstemperatur von $+2^{\circ}\text{C}$, wurde auch ein Einfluß der Ionenzusammensetzung des Inkubationsmediums auf die ethanol-sensitive Auxinbindung festgestellt. Während steigende Konzentrationen von KCl, d.h. die Erhöhung der Ionenstärke im Inkubationsmedium, keine eindeutige Wirkung auf die ethanol-sensitive Auxinbindung haben, stimulieren mehrwertige Metallkationen in der Reihenfolge $\text{La}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ diese Hormonbindung. Hierfür ist als Beispiel in Abb. 6 die Wirkung von La^{3+} auf die Auxinbindung gezeigt. Anionen haben, mit einer Ausnahme, keinen eindeutigen Einfluß auf die Hormonbindung, denn nur in Anwesenheit von N_3^{-} -Ionen im Bindungstest verringert sich das Ausmaß der ethanol sensitiven Auxinbindung erheblich (Abb. 7). Weiterhin ist die ethanol sensitive Auxinbindung vom pH-Wert abhängig und im Bereich von pH 4.5 bis pH 7.0 nachzuweisen, wobei das pH-Optimum bei pH 5.5 liegt (Abb. 8). Diese Ergebnisse schließen unter den genannten Bedingungen, d.h. bei der relativ kurzen Inkubationszeit und der niedrigen Inkubationstemperatur, eine Membranveränderung durch Enzymaktivitäten als Ursache für die Ethanolwirkung auf die Auxinbindung nahezu aus und kennzeichnen dieses Phänomen der ethanol sensitiven Auxinbindung offensichtlich als einen ausschließlich physikochemischen Vorgang. Dabei deuten die nachgewiesene spezifische Ionen- sowie pH-Abhängigkeit der ethanol sensitiven Auxinbindung auf einen bestimmten Ladungs- und Konformationszustand der mikrosomalen Membran als strukturelle Voraussetzung für die Auxinbindung. Diese Vorstellung wird auch durch weitere Ergebnisse gestützt.

Der osmotische Wert des Inkubationsmediums beeinflusst die Auxinbindungseigenschaft der mikrosomalen Membranen, die, in einem Medium mit einer Saccharosekonzentration von 250 mmol l^{-1} präpariert, wahrscheinlich als Membranvesikel vorliegen. Im Bindungstest war die ethanol sen-

sitive Auxinbindung bei einer Saccharosekonzentration unter 100 mmol l^{-1} , d.h. bei einer für die Membranvesikel hypotonischen Bedingung, nicht nachzuweisen und stieg mit zunehmender Saccharosekonzentration bis 250 mmol l^{-1} , d.h. bei der für die Membranvesikel isotonischen Bedingung, bis zu einem Sättigungswert an (Abb. 9). Weiterhin ließ sich eine Wirkung des nicht-ionischen Detergenz TRITON-X-100 auf die ethanol-sensitive Auxinbindung feststellen. Die Bindungseigenschaft der mikrosomalen Membranen wurde durch das Detergenz bis zu einem Volumenverhältnis von 10^{-4} verstärkt und ging bei höheren Konzentrationen sehr stark zurück (Abb. 10). Schließlich wurde die Temperaturempfindlichkeit der ethanol-sensitiven Auxinbindung untersucht. Eine 15min Vorinkubation der mikrosomalen Membranen bei erhöhten Temperaturen im Bereich von $+30^{\circ}\text{C}$ bis $+75^{\circ}\text{C}$ zerstörte wider Erwarten die Bindungseigenschaft der Membranen nicht, sondern führte im Gegenteil zu einer erheblichen Steigerung der ethanol-sensitiven Auxinbindung im anschließenden Bindungstest bei $+2^{\circ}\text{C}$ (Abb. 11). Dieses Ergebnis weist auf eine temperaturabhängige, vielleicht enzymatische Reaktion, die die Membraneigenschaften so verändert, daß die Auxinbindung möglich bzw. stark erhöht wird.

3.2. Die hochaffine Auxinbindung am E.R.

3.2.1. Nachweis

Die $90\,000 \text{ xg}$ -Fraktion von mikrosomalen Membranen aus DC-Zellen war im Saccharosedichtegradienten nicht in verschiedene Subfraktionen aufzutrennen (s. Abb. 1), obwohl sie die Membranfraktionen von Plasmalemma, E.R., Dictyosomen und Tonoplasten enthalten sollte. Folglich konnte die Lokalisation der in den mikrosomalen Membranen nachgewiesenen hochaffinen und ethanol-sensitiven Auxinbindung nicht definiert werden. In dieser Situation wurde für die wei-

tere Charakterisierung der Auxinbindung hinsichtlich ihrer Lokalisation und Eigenschaften die Methode der Membranisolierung nach BOSS & RUESINK (1979) angewendet, die, da die Autoren subzelluläre Membranen aus Protoplasten von DC-Zellen präparierten, hier von besonderem Vorteil war. Bei dieser Methode wird der 2 000 xg-Überstand des Homogenisats von DC-Zellen, der alle cytoplasmatischen Membrantypen und Organellen mit der Ausnahme der Zellkerne enthält, direkt auf einen diskontinuierlichen RENOGRAFIN-Dichtegradienten gegeben. Um für die Tests auf Auxinbindung der einzelnen subzellulären Membranfraktionen ausreichende Mengen an Membranen zu isolieren, war eine saubere Trennung der verschiedenen Membrantypen ohne gegenseitige Kontamination im präparativen Maßstab gefordert. Hierzu wurde die Zusammensetzung der diskontinuierlichen RENOGRAFIN-Dichtegradienten dem jeweiligen Trennungsproblem angepaßt. Diese Methodik ermöglichte die saubere Trennung von Membranfraktionen in ausreichenden Mengen und entsprechend der von BOSS & RUESINK (1979) angegebenen Schwebedichten ihre Identifizierung als Plasmalemma und Mitochondrien (Abb. 12a), E.R. und Dictyosomen (Abb. 12b) sowie leichtes und schweres E.R. (Abb. 12 c).

Bei der Überprüfung der einzelnen Membranfraktionen auf Auxinbindung mit der Methode der Ölphasensedimentation stellte es sich heraus, daß zwar alle Membranfraktionen Auxin, in diesem Fall [^3H]-IAA mit einer spezifischen Radioaktivität von 555 GBq mmol l^{-1} , binden, aber nur die Fraktion des E.R. die Eigenschaft der kompetitiven Auxinbindung aufweist (Tab. 2). Nach einer Auftrennung der E.R.-Membranen in eine leichte (l.E.R.) und eine schwere Membranfraktion (h.E.R.), befand sich ein Großteil der kompetitiven Auxinbindung in der schweren E.R.-Fraktion (h.E.R.). Trotzdem wurde für die weitere Charakterisierung der kompetitiven Auxinbindung die gesamte Fraktion

des E.R. präpariert (Abb. 12 d) und in dem Hormonbindungstest eingesetzt. Daß die über die Schwebedichte im RENO-GRAFIN-Dichtegradienten als E.R. identifizierte Membranfraktion tatsächlich diesen Membrantyp darstellt, konnte durch den Nachweis von enzymatischer Aktivität der Antimycin-A-resistenten NADPH-Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.2.3), dem nach LORD et al. (1973) eindeutigen Markerenzym für E.R., bestätigt werden (Tab. 3).

3.2.2. Eigenschaften

In weiteren Versuchen wurde die in den Membranen des E.R. lokalisierte kompetitive Auxinbindung näher charakterisiert. Hierzu wurden die Ergebnisse der an den mikrosomalen Membranen schon durchgeführten Hormonbindungsversuche berücksichtigt. Dies bedeutete für den Nachweis der kompetitiven Auxinbindung die Verwendung von [^3H]-IAA als Hormon mit einer hohen spezifischen Radioaktivität, die Verwendung von DMSO als organisches Lösungsmittel für hohe Konzentrationen von unmarkiertem Auxin sowie die Anwendung der Ölphasensedimentation zur Trennung von membrangebundenem und freiem Hormon. Außerdem wurden die Auxinbindungsversuche, wenn nicht anders angegeben, bei einer physiologischen Temperatur von $+25^\circ\text{C}$ und einer Inkubationszeit von 30 min durchgeführt.

Im Konkurrenzexperiment mit Membranen des E.R. ging wie bei den mikrosomalen Membranen bei Einsatz einer geringen Konzentration von [^3H]-IAA ($< 5 \text{ nmol l}^{-1}$) mit zunehmender Konzentration an unmarkierter IAA ($< 100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) die Radioaktivität von membrangebundenem Auxin auf einen Endwert zurück (Abb. 13 a). Die graphische Auswertung der Bindungsdaten im SCATCHARD-Plot ergibt wiederum eine hyperbolische Kurve (Abb. 13 b). Für die hochaffine Auxinbindung ließ sich die Dissoziationskonstante mit $K_D = 500 \text{ nmol l}^{-1}$ und bei der gezeigten Präparation die Anzahl der Bindungs-

stellen mit $n = 640 \text{ f mol g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen bzw. 13 000 Bindungsstellen pro DC-Zelle berechnen. Diese Werte entsprechen in der Größenordnung recht gut den Werten für die hochaffine Auxinbindung an mikrosomalen Membranen. Auch ist das Ausmaß der hochaffinen Auxinbindung an den Membranen des E.R. abhängig von der Ionenzusammensetzung des Inkubationsmediums. Mehrwertige Metallkationen stimulieren die Hormonbindung, wobei $\text{Ca}^{2+} > \text{La}^{3+} > \text{Mg}^{2+}$ als Reihenfolge in der Stimulierbarkeit festgestellt werden konnte (Abb. 14 und Abb. 15). Die Ca^{2+} -Stimulation der hochaffinen Auxinbindung nähert sich bei Ca^{2+} -Konzentration über 5 mmol l^{-1} einem Sättigungswert (Abb. 15). Dies weist einerseits auf einen spezifischen Ca^{2+} -Effekt auf die Auxinbindung und andererseits auf eine begrenzte Anzahl von mit Auxin zu besetzenden Hormonbindungsstellen in der Membran des E.R. hin. In Anwesenheit von $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{Ca}^{2+}$ wurde die pH- und die Temperaturabhängigkeit der hochaffinen Auxinbindung am E.R. charakterisiert. Dabei ließ sich ein breites pH-Optimum im physiologischen Bereich vom pH 6 bis pH 8.0 (Abb. 16) und mit zunehmender Temperatur zwischen $+5^\circ\text{C}$ und $+60^\circ\text{C}$ eine sich verstärkende Stimulation der Hormonbindung nachweisen (Abb. 17). Zusammenfassend deuten diese Versuchsergebnisse auf eine in der Membran des E.R. lokalisierte temperaturabhängige Reaktion unter Ca^{2+} -Kontrolle hin, die die Membraneigenschaften verändert, so daß Auxin mit hoher Affinität und in begrenzter Kapazität an der Membran des E.R. gebunden werden kann.

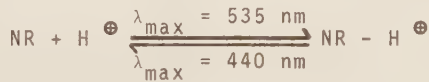
3.3. Die anionenstimulierbare Protonenpumpe am E.R.

3.3.1. Nachweis

Mit dem Nachweis der hochaffinen Auxinbindungsstellen an isolierten Membranen des E.R. aus DC-Zellen stellte sich die Frage nach der möglichen regulatorischen Funktion der Auxinbindung. In diesem Zusammenhang war besonders die Hypothese der Stimulation einer membrangebundenen Protonenpumpe durch Auxin als Erklärung für den Mechanismus der molekularen Wirkung von Auxin interessant (CLELAND, 1971; HAGER et al., 1971; RAY, 1977). Der experimentelle Nachweis einer solchen membrangebundenen ATP-abhängigen Protonenpumpe wird über die Bestimmung des bei der ATP-Hydrolyse freigesetzten Orthophosphats oft durch das Vorhandensein anderer ATP-spaltender Enzyme wie Kinasen, Phosphatasen etc. erschwert oder gänzlich unmöglich. Deshalb ist eine Methode, die die Messung des Aufbaus eines pH-Gradienten über die Membran ermöglicht, aufgrund dieser Nachweisspezifität wesentlich besser geeignet und notwendig. Eine solche Methode ist die photometrische Messung der intravesikulären Ansäuerung mit dem pH-Indikator Neutralrot (HAGER et al., 1980). Voraussetzungen für die Anwendbarkeit dieser Methode sind das Vorliegen der isolierten Membranen in Form von Vesikeln und die Lokalisation der Substratbindungsstelle des Enzyms für ATP an der Außenseite der Vesikelmembran. Nur dann kann die bei der ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie für die Protonentranslokation durch die Vesikelmembran und somit für die Ansäuerung des Vesikellumens genutzt werden.

Das Prinzip der Neutralrotmethode nach HAGER et al.(1980) wird in Abb. 18 gezeigt und nachfolgend kurz beschrieben. Vor Beginn eines Versuchs zur Protonentranslokation hat sich der lipophile Farbstoff Neutralrot zu beiden Seiten

der Vesikelmembran äquilibriert. Bei Ansäuerung des Vesikellumens werden Neutralrotmoleküle protoniert und damit impermeabel für einen Durchtritt durch die Vesikelmembran. Entsprechend diffundieren weitere unprotonierte Farbstoffmoleküle in das Vesikellumen bis zur erneuten Einstellung des Gleichgewichts beiderseits der Membran. Die Ansäuerung des Vesikellumens führt also zu einer allmählichen Anreicherung des Farbstoffes im Vesikellumen. Zudem ändern sich die Absorptionseigenschaften von Neutralrot in der protonierten Form:



Beide Phänomene als Auswirkung der Protonentranslokation in das Vesikellumen lassen sich bei der photometrischen Messung des Reaktionsansatzes mit ATP (Meßküvette) gegen den Reaktionsansatz mit ADP (Vergleichsküvette) im Differenzspektrum verfolgen.

Für die experimentelle Überprüfung auf Aktivität einer Protonenpumpe in den Membranen des E.R. aus DC-Zellen wurden zunächst die Originalbedingungen der Neutralrotmethode von HAGER et al. (1980) übernommen. Dabei konnte in Anwesenheit von ATP eine zeitabhängige Veränderung der Absorption bei $\lambda = 535 \text{ nm}$ im Differenzspektrum zwischen $\lambda = 350 \text{ nm}$ und $\lambda = 700 \text{ nm}$ nachgewiesen werden, die bei Zusatz des Protonophors CCCP voll reversibel war (Abb. 19). Dieses Versuchsergebnis bedeutet:

- 1.) Die Membranen des E.R. aus DC-Zellen liegen in der Form von Vesikeln vor.
- 2.) An der Außenseite der Vesikelmembran befindet sich die ATP-Bindungsstelle eines Enzyms, das

- 3.) die ATP-Hydrolyse irgendwie zu einer gerichteten Protonentranslokation, d.h. zur Ansäuerung des Vesikellumens einsetzen kann.
- 4.) Der Abbau der Absorptionsänderungen im Differenzspektrum von Neutralrot nach Zusatz des Protonophors CCCP beweist, daß die Absorptionsänderungen nicht unspezifisch als Folge einer Farbstoffbindung an die Membran, sondern tatsächlich durch die Ansäuerung des Vesikellumens hervorgerufen werden.

In weiteren Versuchen wurde die von HAGER et al. (1980) übernommene Originalzusammensetzung des Inkubationsansatzes so verändert, daß eine Optimierung der energieabhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranen des E.R. aus DC-Zellen erreicht wurde. Zunächst führte die Erniedrigung des pH-Wertes von pH 7.0 auf pH 6.5 im Testansatz zu einer Stimulation der Protonentranslokation (Abb. 20).

Dann wurde HEPES als Puffersubstanz im Inkubationsmedium durch PIPES ersetzt, um die Versuche mit der Protonenpumpe unter den Bedingungen durchzuführen, wie sie vom Auxinbindungstest vorgegeben waren (Abb. 21). Der Zusatz von 250 mmol l^{-1} Saccharose im Testansatz steigerte das Ausmaß der Protonentranslokation erheblich (Abb. 22). Schließlich wurde Rinderserumalbumin als nicht durch Membranen permeierende Puffersubstanz im Testansatz weggelassen, um zu verhindern, daß die von MURPHY (1979) beschriebene Eigenschaft der unspezifischen Auxinbindung eine mögliche Auxinwirkung auf die Protonenpumpe verhindert. Diese letzte Veränderung hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der Protonenpumpe (Abb. 23). Weiterhin konnte festgestellt werden, daß Mg^{2+} im Testansatz für die Aktivität der Protonenpumpe unbedingt notwendig (Abb. 24) und nicht durch Ca^{2+} zu ersetzen war (Abb. 25).

3.3.2. Energiesubstratspezifität

Die Charakterisierung weiterer Eigenschaften der in den Membranen des E.R. nachgewiesenen Protonenpumpe erfolgte mit dem zuvor beschriebenen optimierten Testansatz, d.h. in einem Inkubationsmedium bei pH 6.5 mit PIPES als Puffersubstanz, mit Saccharose zur osmotischen Stabilisierung der Vesikel und ohne Zusatz von Rinderserumalbumin. In diesen Versuchen wurde die Aktivität der Protonenpumpe nicht mehr über die photometrische Messung des Differenzspektrums von Neutralrot zwischen $\lambda = 350 \text{ nm}$ bis $\lambda = 700 \text{ nm}$ sondern nur noch durch die Messung im Absorptionsmaximum des protonierten Neutralrotmoleküls bei $\lambda = 535 \text{ nm}$ verfolgt. Zunächst wurde die Protonenpumpe hinsichtlich der Spezifität ihres Energiesubstrats untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Protonenpumpe von den Nukleotidtriphosphaten nur ATP aber nicht GTP, UTP oder CTP umsetzen kann (Abb. 26). ATP- γ -S, in der molaren Konzentration wie ATP eingesetzt, hemmt die Aktivität der Protonenpumpe völlig. Auch kann das Enzym ADP nicht für die Protonentranslokation nutzen. Vielmehr wurde das Enzym von millimolaren ADP-Konzentrationen auch in Anwesenheit von ATP gehemmt, dabei liegt die Hemmkonstante des Enzyms für ADP bei $K_i \approx 1.8 \text{ mmol l}^{-1}$ (Abb. 27). Wie schon in einem früheren Versuch festgestellt wurde, kann die Protonenpumpe ohne Zusatz von Mg^{2+} ATP als Energiesubstrat nicht verwerten (s. Abb.24). Folglich wurde die Aktivität der Protonenpumpe in Abhängigkeit von der Konzentration des vermuteten Energiesubstrats $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß zunehmende Konzentrationen von $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ bis 3 mmol l^{-1} stimulierend, höhere Konzentrationen aber wieder hemmend auf die Enzymaktivität wirken (Abb. 28). Die Anwesenheit von KCl im Testansatz bewirkte eine erhebliche Steigerung der Protonentranslokation durch das Enzym. Dabei ließ sich keine veränderte Abhängigkeit

der Enzymaktivität von der Konzentration des Energiesubstrats $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ feststellen. Im LINEWEAVER-BURK-Plot wurde die Affinität der Protonenpumpe zum Energiesubstrat $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ mit einem $K_m \approx 1 \text{ mmol l}^{-1}$ in Ab- und Anwesenheit von KCl bestimmt. Damit beruht die Stimulation durch KCl auf einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, d.h. des H^+ -Flux an der Membran des E.R. (Abb. 29). Die nachgewiesene ausschließliche Substratspezifität der Protonenpumpe für $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ kennzeichnet das Enzym als eine Mg^{2+} -abhängige Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3) mit der Funktion der Protonentranslokation.

3.3.3. Hemmstoffcharakteristik

In weiteren Versuchen ließ sich durch Anwendung von einigen ausgewählten Hemmstoffen nicht nur die Adenosintriphosphatase (ATPase) als das für die Protonentranslokation am E.R. von DC-Zellen verantwortliche Enzym bestätigen, sondern auch der Struktur- und Funktionstyp der ATPase näher charakterisieren. Dabei erfolgte die Auswahl der eingesetzten Hemmstoffe vor allem nach den Erkenntnissen, die BOWMAN et al. (1978) bei der vergleichenden Untersuchung der ATPasen in Mitochondrien und am Plasmalemma von *Neurospora crassa* gewannen. Entsprechend wurden N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) als unspezifischer Hemmstoff von protonentranslozierenden ATPasen, Oligomycin und Natriumazid als spezifische Hemmstoffe der mitochondrialen Kopplungsfaktoren-ATPase sowie Diethylstilbesterol (DES) und Natriumorthovanadat als solche der Plasmalemma-ATPase eingesetzt, um zu klären, ob das protonentranslozierende Enzym am E.R. dem Struktur- und Funktionstyp der mitochondrialen ATPase oder der Plasmalemma-ATPase zuzuordnen ist. Zusätzlich wurde die Wirkung von Organozinnderivaten, weiteren Hemmstoffen der Kopplungsfaktoren-ATPasen in Chloroplasten (GOULD, 1976) und in Mitochondrien (DAWSON

& SELWYN, 1975) sowie von Ouabain, dem Hemmstoff der $\text{Na}^{\oplus}/\text{K}^{\oplus}$ -ATPase in tierischen und pflanzlichen Zellen überprüft (GLYNN, 1964; KYTE, 1975; LINDBERG, 1982).

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. durch entsprechend hohe Konzentrationen von DCCD, DES, Organozinnderivaten und Natriumazid vollständig und von Oligomycin nur gering gehemmt sowie von Natriumorthovanadat und Ouabain nicht beeinflusst wird. Die Hemmbarkeit durch DCCD mit einem $K_i = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Abb. 30) läßt ein intrinsisches Membranprotein mit der Funktion eines "Protonenkanals" als Bestandteil der protonentranslozierenden ATPase am E.R. vermuten, da es bekannt ist, daß DCCD an das Proteolipid, einem bestimmten hydrophoben Membranprotein im F_0 -Teil der Kopplungsfaktoren-ATPasen von Chloroplasten, Mitochondrien und Bakterien, bindet und dabei die Protonenpermeabilität der Membranen blockiert (OVCHINNIKOV et al., 1982). Das Vorkommen eines solchen "Protonenkanals" wird aufgrund ihrer DCCD-Empfindlichkeit allerdings auch für den Typ der Plasmalemma-ATPase diskutiert (BOWMAN et al., 1978; GOFFEAU & SLAYMAN, 1981). Für den "Protonenkanal" als Bestandteil der Protonenpumpe am E.R. könnte auch ihre Empfindlichkeit gegenüber den Organozinnderivaten, weiteren spezifischen Hemmstoffen der Protonenpermeabilität im F_0 -Teil von Kopplungsfaktoren-ATPasen (STOCKDALE et al., 1970; GOULD, 1976) sprechen. Nach einer neueren Untersuchung ist es wahrscheinlich, daß die Organozinnderivate und DCCD an denselben Proteolipid binden (DAWSON et al., 1982). Die Empfindlichkeit der Protonenpumpe am E.R. gegenüber den Organozinnderivaten ist mit einem $K_i < 1 \mu\text{mol l}^{-1}$ sehr hoch. Der genaue Wert der Hemmkonstanten für die Organozinnderivate ließ sich experimentell nicht feststellen, da eine zusätzliche ionophore Wirkung dieser Substanzen nicht ausgeschlossen werden konnte. Es ist nämlich bekannt, daß die Organozinnderivate durch die Membran $\text{Cl}^{\ominus}$ gegen $\text{OH}^{\ominus}$ austauschen (SELWYN

et al., 1970). Die geringe Empfindlichkeit der Protonentranslokation gegenüber Oligomycin (Abb. 31) ist ein weiterer Hinweis für die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit der protonentranslozierenden ATPase mit der mitochondrialen Kopplungsfaktoren-ATPase, da Oligomycin die Protonentranslokation durch spezifische Bindung an das Stielprotein, das bei der mitochondrialen F_0F_1 -ATPase den membrangebundenen F_0 - mit dem peripheren F_1 -Teil verbindet, hemmt (SENIOR, 1979; FILLINGAME, 1980). Natriumazid, das nach der Untersuchung von EBEL & LARDY (1975) an den F_1 -Teil der mitochondrialen ATPase bindet, hemmt nach BOWMAN et al. (1978) die mitochondriale ATPase von *Neurospora crassa* ($K_i = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$) aber, wie in dieser Arbeit gezeigt (Abb. 32), auch die Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen ($K_i = 1 \text{ mmol l}^{-1}$). Jedoch zeigen Untersuchungen an einer späteren Stelle, daß Natriumazid offensichtlich nicht die Aktivität der protonentranslozierenden ATPase hemmt.

Im Gegensatz zur mitochondrialen ATPase wird die Protonenpumpe am E.R. von DES mit einem $K_i = 8 \mu\text{mol l}^{-1}$ gehemmt (Abb. 30). Diese hohe Empfindlichkeit gegenüber DES ist eigentlich für den Typ der Plasmalemma ATPase (z.B. bei *Neurospora crassa* mit einem $K_i = 9 \mu\text{mol l}^{-1}$) charakteristisch. Trotz der Empfindlichkeit gegenüber DES unterscheidet sich die ATPase der Protonenpumpe am E.R. von dem Typ der Plasmalemma-ATPase hinsichtlich des Enzymmechanismus, da ihre Aktivität nicht von Natriumorthovanadat, dem wirksamsten Hemmstoff der ATPase am Plasmalemma von *Neurospora crassa* und auch bei höheren Pflanzen (COCUCCI et al., 1980), nicht gehemmt wird. Dies bedeutet, daß die ATPase der Protonenpumpe im Enzymmechanismus offenbar keinen intermediären Phosphorylierungsschritt aufweist. Denn die Vanadathemmung beruht darauf, daß Vanadat eine stabile trigonale, bipyramidale Struktur ein-

nehmen kann, die dem Übergangszustand von Phosphat während der Enzymreaktion entspricht und dadurch Phosphat an der Bindungsstelle des Enzyms hochwirksam verdrängen kann (LOPEZ et al., 1976). Da die Protonenpumpe am E.R. auch nicht von Ouabain gehemmt wird, entspricht sie auch nicht dem Typ der $\text{Na}^{\oplus}/\text{K}^{\oplus}$ -ATPase bei Pflanzen (LINDBERG, 1982).

Zusammenfassend ergibt die Hemmstoffcharakteristik der Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen folgendes Bild: Mindestens zwei Funktionen sind zu der strukturellen Einheit der Protonenpumpe zusammengefaßt. Davon entspricht eine Funktion der $\text{Mg}^{2\oplus}$ -abhängigen ATPase, die im Enzymmechanismus keinen intermediären Phosphorylierungsschritt aufweist, und die andere Funktion betrifft die Protonentranslokation, die vermutlich von einem intrinsischen Membranprotein mit der Funktion eines "Protonenkanals" durchgeführt wird. Mit diesen Eigenschaften läßt sich die ATPase der Protonenpumpe am E.R. eher dem Struktur- und Funktionstyp der mitochondrialen $\text{F}_0\text{-F}_1$ -ATPase als dem der Plasmalemma-ATPase zuordnen, stellt aber aufgrund der hohen DES-Empfindlichkeit offensichtlich einen veränderten Typ des mitochondrialen Enzyms dar.

3.3.4. Ionenabhängigkeit

Die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. aus DC-Zellen war durch KCl stimulierbar (s. Abb. 28), wobei die Stimulation auf einer Erhöhung des $\text{H}^{\oplus}$ -Flux an der Membran beruhte (s. Abb. 29). In weiteren Versuchen sollte nun geklärt werden, ob die Stimulation der Protonenpumpe durch KCl durch das Kation ($\text{K}^{\oplus}$) oder das Anion ($\text{Cl}^{\ominus}$) verursacht wird. Zunächst wurde die Möglichkeit der Stimulation durch einwertige Kationen überprüft, und KCl wurde im Testansatz durch NaCl, LiCl oder Cholinchlorid ersetzt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Stimulation der Protonenpumpe durch $\text{K}^{\oplus}$, $\text{Na}^{\oplus}$, $\text{Li}^{\oplus}$ oder

Cholin[⊕] festgestellt werden. Entsprechend dem Versuchsergebnis, daß Ouabain, der Hemmstoff der Na[⊕]/K[⊕]-ATPase, die Protonenpumpe nicht hemmt, ließ sich auch keine Änderung im Ausmaß der Protonentranslokation nachweisen, wenn im Testansatz K[⊕] allmählich durch Na[⊕] bei Erhaltung einer konstanten Konzentration von Cl[⊖] ersetzt wurde. In Anwesenheit von NH₄Cl war eine Protonentranslokation nicht nachzuweisen. Bei einer konstanten Konzentration von KCl (hier: 100 mmol l⁻¹) konnte der Aufbau des energieabhängigen Protonengradienten (ΔpH) durch zunehmende Konzentrationen von NH₄Cl vollständig gehemmt werden, wobei die 50 % Hemmung der intravesikulären Ansäuerung schon bei einer Konzentration von 4 mmol l⁻¹ NH₄[⊕] auftrat (Abb. 33). Die Wirkung von NH₄[⊕] läßt sich mit der Annahme erklären, daß NH₃ aus dem Protolysegleichgewicht mit NH₄[⊕] die Vesikelmembran permeiert und zu beiden Seiten der Membran äquilibriert (KLEINER, 1981). Protonen, die das Enzym in das Vesikellumen pumpt, werden dann von NH₃ neutralisiert. Diese Wirkung von NH₄[⊕] ist ein weiterer Beweis für das Vorkommen des pH-Gradienten (ΔpH) an der Vesikelmembran. Zusammenfassend lassen diese Versuchsergebnisse, das Fehlen einer Präferenz für ein einwertiges Kation bei der Stimulation der Protonenpumpe, vermuten, daß die Enzymaktivität nicht durch das einwertige Kation, sondern durch das Anion stimuliert wird.

Die Vermutung einer Stimulation der Protonenpumpe durch Anionen ließ sich experimentell bestätigen. Es stellte sich heraus, daß die Anionen NO₂[⊖], NO₃[⊖], H₂PO₄[⊖]/HPO₄^{2⊖}, SO₄^{2⊖}, CH₃COO[⊖] oder F[⊖] eine Protonentranslokation nicht ermöglichen. Dagegen konnte der energieabhängige Aufbau eines pH-Gradienten (ΔpH) ausschließlich in Anwesenheit bestimmter Halogenidionen nachgewiesen werden, wobei das Ausmaß der Protonentranslokation in der Reihe Cl[⊖] > Br[⊖] > J[⊖] abnahm (Abb. 34). Bei optimalen Konzen-

trationen im Testansatz für ATP und Mg^{2+} ließ sich die Abhängigkeit der Aktivität der Protonenpumpe von der Konzentration des physiologisch relevanten Anions Cl^- in der Form einer Sättigungskurve feststellen. Dabei wird die energieabhängige Protonentranslokation durch Cl^- -Konzentration $< 50 \text{ mmol l}^{-1}$ sehr stark stimuliert und nähert sich bei höheren Cl^- -Konzentrationen allmählich dem Sättigungswert. Die Auswertung der Cl^- -Stimulation der Protonenpumpe im LINEWEAVER-BURK-Plot ergibt für Cl^- einen K_m -Wert von 30 mmol l^{-1} (Abb. 35). Die bisher experimentell nachgewiesenen Eigenschaften kennzeichnen die Protonenpumpe am E.R. als eine Mg^{2+} -abhängige, Cl^- -stimulierbare protonentranslozierende ATPase.

Nun stellte sich die Frage nach dem Mechanismus der Cl^- -Stimulation der Protonenpumpe: Entweder wird die protonentranslozierende ATPase direkt durch die Bindung von Cl^- an das Enzymprotein stimuliert, wie dies von der mitochondrialen F_0F_1 -ATPase bekannt ist (EBEL & LARDY, 1975), oder die Cl^- -Stimulation beruht auf einem H^+/Cl^- -Symport, d.h. auf einem mit dem H^+ -Flux der ATPase funktionell gekoppelten Cl^- -Flux eines Anionenkanals in der Membran. Der Mechanismus des H^+/Cl^- -Symports ließ sich durch die Anwendung von spezifischen Hemmstoffen des Anionentransports (CABANTCHIK et al., 1978) in dem bekannten experimentellen System dieser Arbeit, dem Nachweis der intravesikulären Ansäuerung durch die photometrische Messung des pH-Indikators Neutralrot, problemlos überprüfen. Dabei wurde bei drei verschiedenen Cl^- -Konzentrationen ($20, 40$ und 100 mmol l^{-1}) das Ausmaß der energieabhängigen Protonentranslokation am E.R. in Abhängigkeit von der Konzentration folgender Hemmstoffe gemessen: 4-Acetamino-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure (SITS), 4,4-Diisothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS), Probenecid und Pyridoxal-5'-phosphat. Bei der Auswertung der Ergebnisse im DIXON-Plot (Abb. 36 und

Abb. 37) zeigte es sich, daß alle vier Hemmstoffe die Cl^- -stimulierbare Protonentranslokation mit der folgenden abgestuften Wirksamkeit kompetitiv hemmen: $\text{DIDS} (K_i = 1 \mu\text{mol l}^{-1}) > \text{SITS} (K_i = 2 \mu\text{mol l}^{-1}) > \text{Probenecid} (K_i = 0.5 \text{ mmol l}^{-1}) > \text{Pyridoxal-5'-phosphat} (K_i = 2 \text{ mmol l}^{-1})$. Damit beruht die Cl^- -Stimulation der Protonenpumpe offensichtlich auf dem Mechanismus des H^+/Cl^- -Symports, und der Cl^- -Flux erfolgt vermutlich über einen Cl^- -spezifischen Anionenkanal in der Membran. Folglich setzt sich die Protonenpumpe am E.R. aus einer Mg^{2+} -abhängigen protonentranslozierenden ATPase mit einem mit ihr funktionell gekoppelten Cl^- -spezifischen Anionenkanal zusammen.

Die Bedeutung des elektroneutralen H^+/Cl^- -Symports für den Aufbau des pH-Gradienten (ΔpH) durch die Aktivität der Protonenpumpe ließ sich durch die Wirkung von Ionophoren, die nach PRESSMAN (1976) die Membran für bestimmte Ionen selektiv durchlässig machen, zeigen. Die Versuche mit den Ionophoren wurden in An- und Abwesenheit von KCl im Testansatz durchgeführt (Tab. 4). Gramacidin D, ein Protonophor, verhinderte wie CCCP die intravesikuläre Ansäuerung unabhängig von der An- oder Abwesenheit von K^+ . Dagegen ließ Valinomycin, ein Ionophor mit einer hohen Selektivität für K^+ , den Aufbau des pH-Gradienten (ΔpH) an der Vesikelmembran nur in Abwesenheit von K^+ zu. Auch das Ionophor A 23187, das zweiwertige Kationen (hier: Mg^{2+}) an der Membran gegen H^+ austauscht, beeinträchtigte die intravesikuläre Ansäuerung stark. In Anwesenheit von KCl , d.h. bei einer zusätzlichen Stimulation der Protonenpumpe, wurde die ionophore Wirkung von A 23187 verstärkt. Der Mechanismus des H^+/Cl^- -Symports erklärt auch die Empfindlichkeit der Protonenpumpe gegenüber den Organozininderivaten, die nach SELWYN et al. (1970) als Ionophor Cl^- gegen OH^- an der Membran austauschen. Zudem beruht die schon genannte Hemmung der Protonenpumpe durch Natriumazid auf einer kompetitiven Hemmung

($K_1 = 4 \text{ mmol l}^{-1}$) des $\text{Cl}^\ominus$ -Flux durch $\text{N}_3^\ominus$ (Abb. 38). Schließlich ließ sich die energieabhängige Ansäuerung des Vesikellumens vollständig hemmen, wenn im Testansatz bei einer konstanten $\text{Cl}^\ominus$ -Konzentration steigende $\text{NO}_3^\ominus$ -Konzentrationen zugesetzt wurden (Abb. 39) oder wenn $\text{Cl}^\ominus$ allmählich durch $\text{NO}_3^\ominus$ bei einer konstanten $\text{K}^\oplus$ -Konzentration ersetzt wurde (Abb. 40). Diese Ergebnisse beschreiben ein vielleicht physiologisch bedeutsames Phänomen, sagen aber noch nichts über den Mechanismus der $\text{NO}_3^\ominus$ -Hemmung der Protonenpumpe aus.

In abschließenden Experimenten wurde die Aktivität der Protonenpumpe in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallkationen untersucht. Das Energiesubstrat der Protonenpumpe ist, wie schon experimentell gezeigt wurde, $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$. Folglich wurde das Ausmaß der energieabhängigen Protonentranslokation in Abhängigkeit von der Konzentration von MgCl_2 , das die beiden essentiellen Ionen $\text{Mg}^{2\oplus}$ und $\text{Cl}^\ominus$ enthält, bestimmt. Es stellte sich heraus, daß die Protonenpumpe mit einer zunehmenden Konzentration von MgCl_2 nicht, wie erwartet, kontinuierlich stimuliert wurde, sondern daß eine Stimulation der Protonentranslokation schon bei $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$ nicht mehr auftrat (Abb. 41). Die Vermutung, daß vielleicht hohe $\text{Mg}^{2\oplus}$ -Konzentrationen die Protonentranslokation hemmen, konnte experimentell bestätigt werden, da die Aktivität der Protonenpumpe in Anwesenheit von $100 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KCl}$ bei Konzentrationen von $\text{MgCl}_2 > 4 \text{ mmol l}^{-1}$ ständig zurückging (Abb. 41). Aufgrund dieses Ergebnisses und des früheren Hinweises, daß für die Protonentranslokation $\text{Mg}^{2\oplus}$ nicht durch $\text{Ca}^{2\oplus}$ ersetzt werden kann (s. Abb. 25), wurde die spezifische Wirkung von zweiwertigen Metallkationen genauer untersucht. $\text{Ca}^{2\oplus}$, $\text{Co}^{2\oplus}$ oder $\text{Mn}^{2\oplus}$ ersetzen $\text{Mg}^{2\oplus}$ in seiner Wirkung für die Protonentranslokation nicht, d.h. von den möglichen ATP-Komplexen mit zweiwertigen Metallkationen kann nur

Mg · ATP als Energiesubstrat verwendet werden. In Anwesenheit von Mg^{2+} nahm die Hemmwirkung auf die Protonenpumpe in der Reihenfolge $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ ab. Die starke Hemmwirkung ($K_i \approx 450 \mu\text{mol l}^{-1}$) von Ca^{2+} auf die Protonenpumpe (Abb. 42) ließ sich auch beobachten, wenn nach dem Aufbau des pH-Gradienten (ΔpH) Ca^{2+} zugesetzt wurde (Abb. 43). Der sofortige Abbau des pH-Gradienten (ΔpH) war in seinem Ausmaß von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig, in seiner Geschwindigkeit mit der Wirkung eines Protonophors vergleichbar (Abb. 44) und ließ für den Mechanismus das Vorkommen eines $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiports in der Vesikelmembran vermuten.

Die spezifische Wirkung unterschiedlicher Ionen auf die Aktivität der Protonenpumpe und auf die Aufrechterhaltung des pH-Gradienten (ΔpH) ließ sich in Versuchen mit einer zeitlichen versetzten Zugabe der unterschiedlichen Ionen deutlich zeigen. Als ein Beispiel für Versuche dieser Art ist ein Experiment mit dem sequentiellen Zusatz von Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+} angeführt (Abb. 45). Die Aktivität der Protonenpumpe wird erst bei Anwesenheit von Mg^{2+} stimuliert, und nach Zusatz von Ca^{2+} bricht der aufgebaute pH-Gradient (ΔpH) sofort zusammen. Es ist aber unwahrscheinlich, daß diese *in vitro* beobachtete Regulation der Protonentranslokation am E.R. durch die Wirkung bestimmter Ionen auch dem Mechanismus der *in vivo*-Regulation entspricht (s. Diskussion). Immerhin zeigen diese Ergebnisse über die Ionenabhängigkeit der Protonentranslokation am E.R., daß der Aufbau des pH-Gradienten (ΔpH) durch die Protonenpumpe *in vitro* verhindert wird, wenn

- 1.) die Membran für H^+ oder Cl^- permeabel ist,
- 2.) die negative elektrische Ladung des translozierten Cl^- statt vom H^+ von anderen Kationen wie K^+ neutrali-

siert wird, und

3.) Ca^{2+} auf der Außenseite der Vesikelmembran vorhanden ist.

3.3.5. Regulation

3.3.5.1. Antagonismus von Auxin und Calmodulin

In den vorangegangenen Experimenten konnten das Vorkommen und die Eigenschaften von hochaffinen Auxinbindungsstellen und einer protonentranslozierenden ATPase an den isolierten Membranen des E.R. aus DC-Zellen nachgewiesen werden. Jetzt stellte sich die Frage, ob und, wenn ja, wie die Auxinbindungsstellen und die Protonenpumpe funktionell miteinander gekoppelt waren und sich damit die Hypothese von HAGER et al. (1971), d.h. die Regulation einer membran- gebundenen protonentranslozierenden ATPase durch Auxin, experimentell bestätigen ließ. Hierzu wurde die Wirkung verschiedener Auxine (IAA, NAA bzw. 2,4-D) im Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ auf die Aktivität der Protonenpumpe untersucht. In dem hier als typisches Beispiel gezeigten Versuch konnte eine geringe aber signifikante Stimulation der Protonenpumpe durch Auxin von durchschnittlich 15-20 % gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden (Tab. 5). Die maximale Auxinstimulation lag häufig, so auch in dem gezeigten Versuch, bei sehr geringen Auxinkonzentrationen (10^{-9} bis $10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$). Höhere Hormonkonzentrationen bewirkten eine geringere Stimulation und solche $> 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ führten sogar zu einer Hemmung der Protonentranslokation gegenüber der Kontrolle. Weiterhin war das Ausmaß der Auxinstimulation der Protonenpumpe bei den einzelnen Membranpräparationen und auch beim Vergleich desselben Auxins in parallelen Versuchsansätzen oft nicht einheitlich. Unter der Annahme, daß Auxin die Aktivität der Protonenpumpe kontrolliert,

ist die nachgewiesene *in vitro*-Stimulation der Protonentranslokation durch Auxin in ihrem Ausmaß wahrscheinlich zu gering, um *in vivo* von physiologischer Relevanz für die Pflanzenzelle zu sein.

Nach den Ergebnissen in dieser Arbeit fördert Ca^{2+} in millimolaren Konzentrationen einerseits die Bindung von Auxin an die hochaffinen Bindungsstellen, die an den Membranen des E.R. lokalisiert sind, hemmt aber andererseits den Aufbau eines pH-Gradienten (ΔpH) durch die ebenfalls am E.R. lokalisierte Protonenpumpe über den Mechanismus eines $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiports. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch überprüft, ob Auxin in Anwesenheit von Ca^{2+} die intravesikuläre Ansäuerung dadurch ermöglicht, daß es den Mechanismus des $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiports blockiert. Das Ergebnis zeigte jedoch, daß auch bei Zusatz von Auxin in Anwesenheit von Ca^{2+} in millimolaren Konzentrationen, d.h. unter optimalen Bedingungen für die hochaffine Auxinbindung, ein pH-Gradient (ΔpH) an der Membran nicht aufgebaut wird. Folglich schaltet Auxin den $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiport am E.R. nicht ab und reguliert dadurch die Aktivität der Protonenpumpe.

Das Versuchsergebnis überrascht insofern nicht, als Ca^{2+} im Cytosol von pflanzlichen und tierischen Zellen höchstens in mikromolaren aber nicht in millimolaren Konzentrationen vorkommt (WILLIAMSON, 1981; AKERMAN, 1982). Dabei stimuliert Ca^{2+} als ein intrazelluläres Signal die Aktivität von bestimmten Enzymen und damit letztlich den Ablauf von komplexen zellulären Prozessen in tierischen genauso wie in pflanzlichen Zellen über das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin (KLEE et al., 1980; MEANS & DEDMAN, 1980; MARMÉ 1983). Aus diesem Grund wurde die Wirkung von Calmodulin (CaM) auf die *in vitro*-Aktivität der Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen untersucht. Diese Versuche wurden

mit tierischem CaM bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ in dem bekannten Testansatz durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß die Aktivität der Protonenpumpe *in vitro* durch die Zugabe von exogenem CaM nicht, wie erwartet, stimuliert, sondern stark gehemmt wurde. Die maximale Hemmung der Protonentranslokation ($> 50 \%$) trat schon bei einer CaM-Konzentration von $1 \mu\text{g ml}^{-1} \approx 60 \text{ nmol l}^{-1}$ auf (Abb. 46), und eine zehnfache Konzentration an CaM verstärkte die Hemmwirkung nicht wesentlich. CaM stimuliert Enzyme oft nur im Ca^{2+} -beladenen Zustand, so daß in Anwesenheit von EGTA, einem Komplexbildner für Ca^{2+} , die CaM-Wirkung aufgehoben wird. Diese Wirkung von EGTA zeigte sich auch bei der Aktivität der Protonenpumpe (Abb. 47). Bei Zusatz von 1 mmol l^{-1} EGTA ließ sich die Hemmung der Protonenpumpe durch CaM (-35% gegenüber der Kontrolle) nicht nur vollständig aufheben, sondern es trat sogar eine leichte Stimulation der Protonentranslokation ($+15 \%$ gegenüber der Kontrolle) auf. Selbst in Abwesenheit von exogenem CaM wurde die Aktivität der Protonenpumpe durch EGTA gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht ($+ 40 \%$), und dieser Befund ist vielleicht ein Hinweis für das Vorkommen von endogenem CaM in der Membran. Beide Ergebnisse, Stimulation der Protonentranslokation durch EGTA in Ab- und Anwesenheit von exogenem CaM weisen darauf hin, daß das Ca^{2+} /CaM-System ein negativer Regulator für die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. ist.

In früheren Versuchen konnte in Abwesenheit von exogenem CaM eine fördernde Wirkung von Auxin auf die Aktivität der Protonenpumpe festgestellt werden (s. Tab. 5). Stimuliert Auxin die Protonenpumpe auch in Anwesenheit von exogenem CaM und wirkt somit der Hemmung der Protonenpumpe durch CaM entgegen? Diese Vermutung konnte in weiteren Versuchen tatsächlich bestätigt werden. Alle ge-

testeten Auxine (IAA; NAA; 2,4-D; PAA) oder Substanzen mit auxinähnlicher Molekülstruktur (CPIB ; BA) wirkten im getesteten Konzentrationsbereich zwischen 10^{-10} bis 10^{-6} mol l^{-1} der Hemmung der Protonenpumpe durch CaM in unterschiedlichem Maß entgegen (Tab. 6). Bei dieser Reaktion fiel das Fehlen einer ausgesprochenen Spezifität für Auxin auf, obwohl IAA, NAA und 2,4-D die größte Wirkung erzielten, und bei diesen Substanzen schon Konzentrationen von 10^{-10} mol l^{-1} am stärksten wirkten. Weiterhin war das Ausmaß der Protonentranslokation offensichtlich nicht abhängig von der Hormonkonzentration, denn die getesteten Substanzen waren anscheinend über den weiten Konzentrationsbereich von 1:10 000 nahezu gleich wirksam, die Hemmung der Protonentranslokation durch CaM aufzuheben. Dieses *in vitro*-Ergebnis entspricht dem *in vivo*-Phänomen vieler physiologischer Reaktionen, die von Auxin kontrolliert werden (KENDE & GARDNER, 1976). Schließlich nahm das Ausmaß der Auxinstimulation, d.h. die Aufhebung der CaM-bedingten Hemmung der Protonentranslokation, kontinuierlich mit der Reaktionszeit zu (Abb. 48). Dieses Phänomen konnte bei jeder der getesteten Hormonkonzentrationen unabhängig vom Ausmaß der Auxinstimulation festgestellt werden und wies auf eine zeitabhängige, durch Auxin kontrollierte Reaktion hin, die die Stimulation der Protonenpumpe ermöglicht. Letztlich bedeuten diese Ergebnisse, daß ein Antagonismus von Auxin und CaM die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen *in vitro* reguliert.

3.3.5.2. Reversible Proteinphosphorylierung

In weiteren Experimenten sollte folgende Fragestellung beantwortet werden: Wie hemmt CaM und wie stimuliert Auxin die Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen? Zunächst wurde die Hemmung der Protonentranslokation durch CaM näher untersucht. Aus der Literatur war es bekannt, daß CaM die Aktivität von CaM-abhängigen Enzymen stimuliert

aber nicht hemmt und daß die CaM-Wirkung durch die Bindung von CaM an das Enzymprotein hervorgerufen wird (KLEE et al., 1980; MEANS & DEDMAN, 1980). Dies bedeutete für die Hemmung der Protonenpumpe durch CaM: Entweder ist die Protonenpumpe am E.R. das erste in der Literatur beschriebene Enzym, das bei einer direkten Wechselwirkung von CaM und Enzym in seiner Aktivität gehemmt wird, oder CaM kontrolliert das Ausmaß der Protonentranslokation indirekt, indem es ein Enzym aktiviert, Modifikationen an einem Protein der Protonenpumpe durchzuführen, die sich auf die Aktivität der Protonenpumpe hemmend auswirken. Der zweite Mechanismus konnte experimentell bestätigt werden. Ausgangspunkt für die Experimente war das Wissen, daß in tierischen Zellen eine Modifikation von Proteinen die reversible Proteinphosphorylierung ist, die von CaM-kontrollierten Enzymen durchgeführt wird. Dabei kann CaM die Phosphorylierung eines Proteins über eine Proteinkinase (EC 2.7.1.37) oder seine Dephosphorylierung über eine Phosphoproteinphosphatase (EC 3.1.3.16) stimulieren (COHEN, 1982). Ob ein, und wenn ja, welcher Typ von Enzym für die reversible Proteinphosphorylierung an der Membran des E.R. von DC-Zellen vorkommt und seine Aktivität durch CaM stimulierbar ist, wurde im bekannten Testansatz der *in vitro*-Protonentranslokation durch die Anwendung von folgenden Hemmstoffen für die Phosphoproteinphosphatase untersucht: Ammoniumheptamolybdat (PAIGEN, 1958), Kaliumfluorid (KHATRA & SODERLING, 1978) und Natriumorthovanadat (SWARUP et al., 1982). Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

In Abwesenheit von exogenem CaM erhöhten die Hemmstoffe die Aktivität der Protonenpumpe gegenüber der Kontrolle nur gering (0.1 mmol l⁻¹ Molybdat: +17 %; 1 mmol l⁻¹ Vanadat: +24 %; 2 mmol l⁻¹ Fluorid: +34%). Dagegen war die Hemmstoffwirkung im Vergleich zur Kontrolle in Anwesen-

heit von $1\mu\text{g ml}^{-1}$ CaM sehr viel stärker (0.1 mmol l^{-1} Molybdat: +33 %; 1 mmol l^{-1} Vanadat: +102 %; 2 mmol l^{-1} Fluorid: +138%). Diese Wirkung der Hemmstoffe von Phosphoproteinphosphatasen auf die CaM-bedingte Hemmung der Protonentranslokation kann als spezifisch angesehen werden, da einerseits Vanadat durch Phosphat in der Wirkung nicht zu ersetzen war und andererseits das Ausmaß der Protonentranslokation in Ab- und Anwesenheit von exogenem CaM durch EGTA (1 mmol l^{-1}) unterschiedlich stark erhöht wurde. Eine stärkere Aufhebung der CaM-bedingten Hemmung der Protonentranslokation durch höhere Konzentrationen von Ammoniumheptamolybdat war bei der Methode, der Messung des Aufbaus eines pH-Gradienten (ΔpH) über die Vesikelmembran, nicht zu erzielen, da, wie schon gezeigt wurde, millimolare Konzentrationen von NH_4^+ die intravesikuläre Ansäuerung neutralisieren (s. Abb. 33). Dagegen ließ sich die CaM-bedingte Hemmung der *in vitro*-Protonentranslokation durch steigende Konzentrationen von Natriumorthovanadat vollständig aufheben, wobei $150\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ Vanadat die 50 % Aufhebung bewirkten (Abb. 49). Die Aufhebung der CaM-bedingten Hemmung der Protonentranslokation durch die Hemmstoffe von Phosphoproteinphosphatasen verdeutlicht den Mechanismus, über den CaM die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. kontrolliert: CaM stimuliert offenbar eine Phosphoproteinphosphatase, deren Aktivität ein Protein der Protonenpumpe (ATPase oder Anionenkanal?) dephosphoryliert und dadurch inaktiviert.

Die Proteinphosphorylierung, die antagonistische Reaktion zur Aktivität der Phosphoproteinphosphatase, ließ sich durch die Wirkung von spezifischen Proteinkinaseinhibitoren auf die *in vitro*-Protonentranslokation am E.R. nachweisen. Diese Proteinkinaseinhibitoren sind niedermolekulare Proteine aus tierischen Zellen und hemmen die Aktivität von bestimmten Proteinkinasen, indem sie mit dem

Substrat um die Bindung an die katalytische Untereinheit des Enzyms kompetieren (DEMAILLE et al., 1977). Sowohl der Proteinkinaseinhibitor aus Schweineherz vom Typ III (Abb. 50) als auch der aus Kaninchenmuskel (Abb. 51) hemmt *in vitro* die Aktivität der Protonenpumpe, und diese Hemmung war abhängig von der Konzentration des Proteinkinaseinhibitors (Abb. 50). In Anwesenheit von exogenem CaM und des Proteinkinaseinhibitors war das Ausmaß der *in vitro*-Protonentranslokation geringer als nur bei einer Zugabe von CaM aber wider Erwarten größer als bei einer Zugabe des Proteinkinaseinhibitors (Abb. 51). Dieses Ergebnis läßt sich als ein Zusammenspiel von Proteinkinase und Phosphoproteinphosphatase bei der Regulation der Aktivität der Protonenpumpe durch die reversible Proteinphosphorylierung interpretieren.

Die vorliegenden Ergebnisse, d.h. die Wirkung von Auxin und CaM sowie die von Hemmstoffen der Phosphoproteinphosphatasen und Proteinkinasen auf die *in vitro*-Protonentranslokation, bedeuten letztlich, daß der Antagonismus von Auxin und CaM die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. *in vitro* über den Mechanismus der reversiblen Proteinphosphorylierung reguliert. Dabei hemmt CaM die Protonentranslokation offensichtlich über die Stimulation der Proteindephosphorylierung der Protonenpumpe. Wie stimuliert nun Auxin die Proteinphosphorylierung der Protonenpumpe und damit die Protonentranslokation? Entweder ist die Proteinkinase selbst der Auxinrezeptor und damit die Proteinphosphorylierung die Primärreaktion des Auxins oder eine membrangebundene Reaktion, die die Proteinkinase stimuliert, ist die Primärreaktion des Auxins.

In tierischen Zellen kommt eine Proteinkinase vor, deren Bindung an die Membran und deren Enzymaktivität von der Freisetzung von Diacylglycerol durch die Hydrolyse von membrangebundenem Phosphatidylinositol abhängig ist

(NISHIZUKA, 1983). Dieses Enzym wird als Proteinkinase C bezeichnet (TAKAI et al., 1979 a), und seine Aktivität wird durch sehr geringe Konzentrationen von Phenothiazinderivaten (SCHATZMAN et al., 1981) und von Polymyxin-B-sulfat (MAZZEI et al., 1982) gehemmt. Folglich wurde die Wirkung dieser Substanzen auf die *in vitro*-Aktivität der Protonenpumpe in Abwesenheit von exogenem CaM, d.h. bei einer möglichst geringen nativen Aktivität der Phosphoproteinphosphatase, überprüft. Unter diesen Bedingungen hemmten zwei repräsentative Vertreter der Phenothiazinderivate, nämlich Trifluoperazin (TFP) und Chlorpromazin (CPZ) die Protonentranslokation in Abhängigkeit von ihrer Konzentration. Die 50 %-Hemmung der Protonentranslokation ließ sich mit $20 \mu\text{mol l}^{-1}$ TFP bzw. $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ CPZ und die vollständige Hemmung mit $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ TFP bzw. $>300 \mu\text{mol l}^{-1}$ CPZ erreichen (Abb. 52). Aufgrund der Hemmung der Protonentranslokation ist es anzunehmen, daß die Phenothiazinderivate hier offenbar nicht als Antagonisten (LEVIN & WEISS, 1977, 1979) von endogenem CaM wirken und tatsächlich die für die Protonentranslokation notwendige Proteinphosphorylierung der Protonenpumpe durch eine Proteinkinase C hemmen, zumal die Protonentranslokation auch bei sehr niedrigen Konzentrationen von Polymyxin-B-sulfat ($K_i \approx 5 \mu\text{mol l}^{-1}$) verhindert wurde (Abb. 53). Das Vorkommen einer phospholipidabhängigen Proteinkinase C am E.R. von DC-Zellen würde bedeuten, daß die Aktivität der Protonenpumpe letztlich von einer bestimmten Änderung der Membraneigenschaft, der Freisetzung von Diacylglycerol, das die Proteinkinase C aktiviert, abhängig ist. Diese Änderung der Membraneigenschaft könnte durch die Bindung von Auxin an die membran-gebundenen hochaffinen Bindungsstellen am E.R. als Primärreaktion des Phytohormons ausgelöst werden.

3.4. Nachweis von lipolytischen Enzymen am E.R.

Nach den Untersuchungen in dieser Arbeit sind an den aus DC-Zellen isolierten Membranen des E.R. offensichtlich sowohl die hochaffine Auxinbindung als auch die Stimulation der Protonentranslokation durch die Proteinphosphorylierung der Protonenpumpe von Änderungen der Membraneigenschaften abhängig. Dabei schlossen die Methode zur Präparation der Membranfraktion des E.R., nämlich die Zentrifugation im diskontinuierlichen RENOGRAFIN-Dichtegradienten und das anschließende mehrmalige Waschen der isolierten Membranen sowie die Zusammensetzung der Versuchsansätze für den *in vitro*-Nachweis der Auxinbindung bzw. der Protonentranslokation aus, daß die Änderungen der Membraneigenschaften auf einer endogenen Neusynthese von Phospholipiden am E.R. beruhen. Es war vielmehr anzunehmen, daß lipolytische Enzyme membrangebundene Phospholipide als endogene Substrate umsetzen und die Hydrolyseprodukte die Membraneigenschaften des E.R. ändern. Die Phospholipase D (EC 3.1.4.4) und die Phosphatidylsäurephosphatase (EC 3.1.3.4) sind in pflanzlichen Zellen lipolytische Enzyme, die in der membrangebundenen Form vor allem am E.R. lokalisiert sind (ROUGHAN & SLACK, 1976; MOORE et al., 1973). Diese Enzymaktivitäten ließen sich auch *in vitro* an den aus DC-Zellen isolierten Membranen des E.R. nachweisen.

Die Aktivität der membrangebundenen Phospholipase D wurde über die Hydrolyse des künstlichen und wasserlöslichen Substrats p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC) entsprechend der Methode von GUPTA & WOLD (1980) bestimmt. Dabei erfolgte die Bestimmung über die photometrische Messung des freigesetzten p-Nitrophenol ohne die Zugabe einer exogenen sauren Phosphatase, da an den Membranen des E.R. endogene Phosphatasen vorkommen, die p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol und Phosphat umsetzen. Obwohl unter diesen Bedingungen eine zusätzliche enzymatische Hydrolyse

von NPPC durch die membrangebundenen Phosphatasen wie sie von SRIVASTAVA et al. (1982) beschrieben wird, nicht ausgeschlossen werden kann, ist dies unwahrscheinlich, da in DC-Zellen die Aktivität der Phospholipase D auch über die Hydrolyse von membrangebundenen Phospholipiden nachgewiesen wurde (KLEINIG & KOPP, 1978). In einem als Kontrolle konzipierten Versuch ließ sich in Anwesenheit des Phosphatasehemmstoffes Natriumorthovanadat eine von der Phosphataseaktivität unabhängige Hydrolyse von NPPC nachweisen. Diese Enzymaktivität erfolgte offensichtlich durch eine membrangebundene Phospholipase C (EC 3.1.4.3 bzw. EC 3.1.4.10), die nach KURIOKA & MATSUDA (1976) NPPC zu p-Nitrophenol und Cholinphosphat spaltet. Folglich war die enzymatische Hydrolyse von NPPC an den isolierten Membranen des E.R. auf die Aktivität von zwei unterschiedlichen Enzymen, nämlich der Phospholipase C und der Phospholipase D zurückzuführen (Abb. 54). Im Gegensatz zur Phospholipase C war die Aktivität der Phospholipase D von Ca^{2+} in millimolarer Konzentration abhängig (Abb. 54). Dagegen unterschieden sich die beiden Enzyme, wie die K_m -Werte zeigen, kaum in der Affinität zum künstlichen und wasserlöslichen Substrat NPPC: K_m (Phospholipase D) = 20 mmol l^{-1} bzw. K_m (Phospholipase C) = 50 mmol l^{-1} (Abb. 55). Weiterhin konnte bei einem Zusatz von Ca^{2+} (10 mmol l^{-1}) in Abwesenheit von Natriumorthovanadat eine beträchtliche enzymatische Hydrolyse von NPPC auch bei sehr niedrigen Temperaturen festgestellt werden. Die hydrolytische Aktivität betrug bei +2 °C schon $1.4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen und war bei +25°C mit $2.0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen nicht wesentlich höher. Dieses Ergebnis zeigt, daß *in vitro* selbst bei sehr niedrigen Temperaturen lipolytisch-bedingte Änderungen der Membranzusammensetzung, d.h. auch der Membraneigenschaften an den Membranen des E.R. stattfinden. Schließlich wurde festgestellt, daß Auxin die Hydrolyse von NPPC über die Enzymaktivitäten der beiden Phospholipasen nicht beeinflusst.

An den Membranen des E.R. konnte die Phosphatidylsäurephosphatase (EC 3.1.3.4) als ein weiteres membrangebundenes lipolytisches Enzym nachgewiesen werden. Das Enzym baut die bei der Hydrolyse von Phospholipiden durch die Phospholipase D freigesetzte Phosphatidylsäure zu Diacylglycerol und Orthophosphat ab. In Anwesenheit von 2 mmol l^{-1} exogener Phosphatidylsäure und 1 mmol l^{-1} EGTA betrug die Aktivität des Enzyms bei $+25^\circ\text{C}$ zwischen $100\text{--}200 \text{ pmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen. Diese Enzymaktivität ließ sich bei Anwesenheit von Ca^{2+} in millimolaren Konzentrationen nahezu verdoppeln. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von SCHERER & MORRÉ (1978) konnte eine Hemmung der Enzymaktivität durch Auxin nicht beobachtet werden. Mit dem Nachweis der Phosphatidylsäurephosphatase kommen an den Membranen des E.R. zwei unterschiedliche lipolytische Reaktionen vor, die in den Membranen Diacylglycerol, den aktivierenden Faktor der Proteinkinase C, freisetzen. Bei einer Nutzung der membrangebundenen Phospholipide als endogene Substrate für die Aktivität der lipolytischen Enzyme wird Diacylglycerol einerseits bei der Hydrolyse von Phosphatidylinositol durch die Phospholipase C geliefert und andererseits durch die Aktivität der Phosphatidylsäurephosphatase aus Phosphatidylsäure freigesetzt, die bei der Hydrolyse von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin durch die Phospholipase D anfällt.

3.5. Freisetzung von membrangebundenem Phosphat durch Auxin

SCHERER & MORRÉ (1978) beobachteten an isolierten Membranen von *Glycine max* eine *in vitro*-Stimulation bei der Freisetzung von membrangebundenem Phosphat durch Auxin, nennen aber für dieses Phänomen keinen Mechanismus. In dieser Arbeit konnte die Aktivität von mindestens drei membrangebundenen lipolytischen Enzymen, nämlich der Phospholipase C,

der Phospholipase D und der Phosphatidylsäurephosphatase, an den aus DC-Zellen isolierten Membranen des E.R. nachgewiesen werden. Bei diesen Untersuchungen wurden von den genannten Enzymen exogene Substrate umgesetzt, und bei diesen *in vitro*-Reaktionen konnte eine Regulation der Enzymaktivitäten durch Auxin nicht festgestellt werden. Die genannten lipolytischen Enzyme hydrolysieren in der Zelle aber membrangebundene Phospholipide als endogene Substrate, und bei diesen enzymatischen Reaktionen wird Phosphat aus der Membran freigesetzt. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol zu Diacylglycerol und Inositolphosphat, das durch membrangebundene Phosphatasen zu Inositol und Phosphat metabolisiert werden kann. Die Phospholipase D setzt bei der Hydrolyse von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin die Phosphatidylsäure frei, die durch die Phosphatidylsäurephosphatase zu Diacylglycerol und Phosphat gespalten wird. Ausgehend von diesen Kenntnissen über den Phospholipidmetabolismus am E.R. wurde die Freisetzung von membrangebundenem Phosphat durch Inkubation der isolierten Membranen des E.R. in Ab- und Anwesenheit von Auxin (IAA) untersucht (Abb. 56).

In Anwesenheit von 10 mmol l^{-1} EGTA, d.h. unter Bedingungen, unter denen nur die Phospholipase C aktiv ist (s. Abb. 54), konnte in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration eine zunehmende Stimulation der Phosphatfreisetzung durch Auxin gegenüber der Kontrolle gemessen werden, und bei $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ Auxin betrug die Stimulation schließlich 200 %. Diese Stimulation der Phosphatfreisetzung durch Auxin wurde in Anwesenheit von $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, d.h. unter optimalen Bedingungen für die hochaffine Auxinbindung (s. Abb. 15) und für die Aktivität der Phospholipase D noch verstärkt, und ein Reaktionsoptimum wurde schon bei $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ erreicht. Dagegen war in Anwesenheit von $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ und $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1} \text{ CaM}$ die Stimulation der Phosphatfreisetzung nur noch gering, und die Kontrollaktivität lag sehr hoch. Diese *in vitro*-Ergebnisse über die Freisetzung von membrangebundenem Phosphat durch Auxin

lassen sich bei aller Vorsicht wie folgt interpretieren:

- 1.) Die Primärreaktion des Auxins ist offensichtlich die Stimulation einer membrangebundenen Phospholipase C am endoplasmatischen Retikulum (E.R.).
- 2.) Diese Primärreaktion des Auxins wird durch die Aktivität der Phospholipase D mindestens verstärkt, wenn nicht sogar ermöglicht.
- 3.) Unter den genannten *in vitro*-Bedingungen wirkt Ca^{2+} / CaM antagonistisch auf die hypothetische Primärreaktion des Auxins.

4. Diskussion

4.1. Die hochaffine Auxinbindungsstelle am endoplasmatischen Retikulum von DC-Zellen

Ein Ausgangspunkt für Untersuchungen zur molekularen Wirkung des Auxins ist die Hormonrezeptorhypothese. Dieses Konzept besagt, daß das Hormon seine biologische Wirkung nur bei Bindung an eine subzelluläre Struktur, dem Rezeptor, erzielt. Dies bedeutet letztlich, daß der Rezeptor zwei wesentliche Funktionen erfüllen muß: Die Bindung des Hormonmoleküls an den Rezeptor ist die Folge der Diskriminierung von unterschiedlichen Signalmolekülen in der Zelle. Der gebildete Hormonrezeptorkomplex löst eine definierte Primärreaktion aus, die die physiologischen Eigenschaften und Leistungen der Zelle in der für das Hormon charakteristischen Weise verändert. Daraus ergeben sich bestimmte Eigenschaften des Rezeptors, die für seine eindeutige Identifizierung experimentell nachzuweisen sind (CUATRECASAS & HOLLENBERG, 1976). Die Eigenschaften der Spezifität und Affinität des Rezeptors ermöglichen nur die Bindung von Hormonmolekülen am Rezeptor und dies selbst bei einer sehr niedrigen Hormonkonzentration in der Zelle. Entsprechend findet sich nur eine begrenzte Anzahl, d.h. geringe Kapazität von Hormonrezeptoren in den hormonsensitiven Zellen. Die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor ist reversibel und ermöglicht damit eine zeitlich begrenzte Auslösung der Primärreaktion. Diese Aussagen der Hormonrezeptorhypothese sind natürlich auch Kriterien für die Identifizierung eines Rezeptors für das Phytohormon Auxin (HERTEL & FLORY, 1968; HERTEL et al., 1969; KENDE & GARDNER, 1976; RUBERY, 1981). Es ist das besondere Verdienst von HERTEL und seinen Mitarbeitern, als erste dieses Konzept konsequent für den experimentellen Nachweis von Auxinbindung an subzellulären Fraktionen aus Pflanzenzellen angewendet zu haben (HERTEL et al., 1972). Obwohl diesen Autoren die eindeutige Identifizierung des für die Primärreaktion ver-

antwortlichen Auxinrezeptors damals noch nicht gelungen ist, wurde seitdem die Hormonrezeptorhypothese als experimenteller Ansatz für die Aufklärung der molekularen Wirkung des Auxins von zahlreichen Autoren immer wieder angewendet (RUBERY, 1981). Auch in dieser Arbeit über die Primärreaktion des Auxins in DC-Zellen war die Hormonrezeptorhypothese eine wesentliche Grundlage der experimentellen Untersuchungen. Folglich war der Nachweis von Auxinbindung an mikrosomalen Membranen die Voraussetzung zur Aufklärung der molekularen Wirkung von Auxin in DC-Zellen.

Das Phänomen der Auxinbindung ließ sich an allen aus DC-Zellen isolierten Membranfraktionen nachweisen, aber nur eine bestimmte Membranfraktion zeigte die Eigenschaft der kompetitiven Auxinbindung, d.h. nur sie war mit einer begrenzten Anzahl von hochaffinen Auxinbindungsstellen ausgestattet. Diese Membranfraktion enthielt die Membranen des endoplasmatischen Retikulums (E.R.). Diese Identifizierung ist durch den Nachweis von folgenden Enzymaktivitäten ausschließlich biochemisch abgesichert:

- 1) Die Membranen sedimentieren in RENOGRAPHIN-Dichtegradienten bei einer Schwebedichte von $\rho \leq 1.092 \text{ g cm}^{-3}$, die nach BOSS & RUESINK (1979) charakteristisch für E.R.-Membranen aus DC-Zellen ist.
- 2) Die Membranen enthalten das für E.R. spezifische Markerenzym, die Antimycin-A resistente NADPH-Cytochrom c-Reduktase, EC 1.6.2.3 (LORD et al., 1973; QUAIL, 1979).
- 3) Schließlich enthalten die Membranen folgende für den Phospholipidmetabolismus am E.R. wichtigen Enzyme (MUDD, 1980; MOORE, 1982):
Phospholipase D (EC 3.1.4.4), Phosphatidylsäurephosphatase (EC 3.1.3.4), CTP-Phosphatidylsäurecytidyltransferase (EC 2.7.7.41), Glycerophosphat: CDP-Diacylglycerol-

phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.5) und CDP-Diacylglycerol-myo-inositol-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.11).

Für das Vorkommen der drei für die Phospholipidsynthese verantwortlichen Enzyme gibt es experimentelle Hinweise, auf die hier im Rahmen der Untersuchungen zur molekularen Wirkung von Auxin nicht eingegangen werden soll.

Die kompetitive Auxinbindung an der E.R.-Membran ließ sich nur bei Verwendung von [^3H]-IAA im Hormonbindungstest und auch nur mit der Ölphasensedimentation nach GLIEMANN et al., (1972) bei der anschließenden Trennung von membrangebundenem und freiem Auxin nachweisen. Die Notwendigkeit der Verwendung von [^3H]-IAA im Kompetitionsexperiment ergibt sich aus der geringen Anzahl von Bindungsstellen ($\sim 1 \text{ pmol g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen) und dem relativ hohen Wert der Dissoziationskonstanten ($K_D = 500 \text{ nmol l}^{-1}$). Nur mit [^3H]-IAA ist es aufgrund seiner hohen spezifischen Radioaktivität (0.55 bzw. $1.07 \text{ TBq mmol}^{-1}$) möglich, radioaktives Auxin in einer sehr niedrigen Konzentration im Hormonbindungstest einzusetzen, seine Radioaktivität nach Bindung an die Membran noch zu messen und mit zunehmender Konzentration an unmarkiertem Hormon den Verlauf der Absättigung der Bindungsstelle zu verfolgen. Dagegen besitzt [^{14}C]-NAA eine vergleichsweise geringe spezifische Radioaktivität (1.6 bis $2.0 \text{ GBq mmol}^{-1}$), so daß bei Verwendung der kleinsten Auxinkonzentration, deren Radioaktivität nach der Hormonbindung gerade noch meßbar ist, schon alle hochaffinen Bindungsstellen abgesättigt sind, und folglich bei steigender Konzentration von unmarkiertem Hormon eine Kompetition nicht zu beobachten ist. Auch an anderen Objekten war der Nachweis von hochaffinen Phytohormonbindungsstellen gelegentlich nur bei Verwendung von tritiiertem Hormon mit hoher spezifischer Radioaktivität möglich. Dies wird z.B. berichtet für die cytoplasmatische Auxinbindung (OOSTROM et al., 1975, 1980) und die mikrosomale Cytokininbindung (SUSSMAN & KENDE, 1978) von *in vitro* kultivierten Zellen von *Nicotiana tabacum*.

Weiterhin war der Nachweis der kompetitiven Auxinbindung nur mit dem Ölphasensedimentationstest aber nicht mit den Methoden der Normalsedimentation, der Gleichgewichtsdialyse oder der Filtration möglich. Im Vergleich zum Normalsedimentationstest nach LEMBLI et al. (1971) weist der Ölphasensedimentationstest nach GLIEMANN et al. (1972) folgende Vorteile auf:

- 1) Die Ölphase ermöglicht eine sehr schnelle und wirksame Trennung freier und membrangebundener Liganden, und
- 2) das als "Trapping" bezeichnete Phänomen, daß nach der Zentrifugation trotz Abkippen des Überstandes Pufferreste mit freien Liganden das Pellet benetzen, wird verhindert.

Entsprechend den Ausführungen von CUATRECASAS & HOLLENBERG (1976) ist für Liganden mit einer kleinen Molekularmasse (MM), also theoretisch auch für IAA (MM = 175), mit einer diffusionskontrollierten und damit im Wert sehr hohen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten ($k_1 \approx 10^{10} \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) zu rechnen. Dies bedeutet für den Auxinrezeptorkomplex bei einer Dissoziationskonstanten im physiologischen Konzentrationsbereich zwischen $10^{-9} - 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ eine Halbwertszeit im ms-Bereich. In dieser Situation ist für den Nachweis des Hormonrezeptorkomplexes eine Methode für die extrem schnelle und wirksame Trennung von Membranen und Inkubationsmedium notwendig, wie sie die Ölphasensedimentation darstellt, oder die Bindung muß ohne Störung des Reaktionsgleichgewichts mittels Gleichgewichtsdialyse bzw. Gleichgewichtsfiltration gemessen werden. Nach den bisher einzigen in der Literatur vorliegenden kinetischen Analysen einer Auxinbindungsreaktion liegt die Halbwertszeit von Auxinrezeptorkomplexen aber im min-Bereich (LIBBENGA et al., 1982; MAAN et al., 1983), so daß die Verwendung der Ölphasensedimentation zum Nachweis der geringen Anzahl von hochaffinen Auxinbindungsstellen an E.R.-Membranen aus DC-Zellen wohl eher am Phänomen des "Trapping" liegt.

Für den Auxinbindungstest mittels Ölphasensedimentation wurde ein Gemisch von Dibutylphthalat und Dinonylphthalat im Volumenverhältnis 9:4 und mit einer Dichte von $\rho = 1.028 \text{ g cm}^{-3}$ verwendet, so daß nach der Zentrifugation die pelletierten Membranen mit dem gebundenen Auxin von der Pufferphase mit dem freien, ungebundenen Auxin durch die Ölphase getrennt waren. Im übrigen scheint die Sedimentation durch eine Ölphase, bestehend aus diesen Substanzen, die Zellmembranen nicht wesentlich zu verändern, denn tierische Zellen waren nach der Ölphasensedimentation noch voll lebensfähig und reagierten normal auf die Applikation von Insulin, dessen Rezeptor an der Außenseite des Plasmalemma lokalisiert ist (GLIEMANN et al., 1972; BENNETT & CUATRECASAS, 1973). Folglich kann mit einiger Berechtigung davon ausgegangen werden, daß sich die verwendeten Substanzen der Ölphase auch gegenüber den Membranen aus DC-Zellen inert verhalten. Das "Trapping"-Phänomen verhinderte offenbar auch den Nachweis der kompetitiven Auxinbindung an E.R.-Membranen aus DC-Zellen mit der Methode der Filtration, denn die Membranfilter aus Cellulosederivaten bzw. Glasfasern enthielten nach der Filtration mit Unterdruck Pufferreste, deren Radioaktivität die der Hormonbindung an biologischen Membranen um ein Vielfaches übertraf und zudem in ihrem Ausmaß bei den einzelnen Versuchsansätzen unterschiedlich ausfiel. Dagegen ließ sich die Methode der Gleichgewichtsdialyse nicht anwenden, da die Konzentration des an die hochaffinen Bindungsstellen gebundenen Hormons im Vergleich zu der des freien Hormons äußerst gering war und die Unterschiede im Bereich der statistischen Streuung lagen.

Wie schon erwähnt, ist das "Trapping" bei Anwendung der Ölphasensedimentation zu vernachlässigen. Trotzdem geht bei der Konkurrenz von radioaktiv markiertem mit unmarkiertem Auxin im Überschuß die an den Auxinbindungsstellen der E.R.-Membranen gebundene Radioaktivität nicht vollständig zurück.

Vielmehr übertrifft die an den Membranen gebundene nicht-kompetitive sogar die kompetitive Radioaktivitätsmenge. Auch zeigen die anderen subzellulären Membranen wie die des Golgi-Apparates, des Plasmalemma und der Mitochondrien aus DC-Zellen die Eigenschaft der nichtkompetitiven Auxinbindung. Die Membraneigenschaft der nichtkompetitiven Auxinbindung wurde auch an vielen anderen Untersuchungsobjekten gefunden (RUBERY, 1981). Die graphische Auswertung der Meßergebnisse von Auxinbindungstests erfolgt gewöhnlich nach SCATCHARD (1949). Im SCATCHARD-Plot ergibt sich bei dem Vorkommen nur einer Bindungsart für die kompetitive Auxinbindung eine Gerade mit negativer Steigung bzw. für die nichtkompetitive Auxinbindung eine Gerade parallel zur Abszisse. Bei Anwesenheit beider Bindungsarten, wie auch an den E.R.-Membranen aus DC-Zellen, findet sich im SCATCHARD-Plot eine biphasische Kurve. Der steile Kurvenast, der auf die kompetitive Auxinbindung zurückgeht, verläuft als Asymptote zur Ordinate und geht kontinuierlich in den flachen Kurvenast über, der schließlich parallel zur Abszisse verläuft und die nichtkompetitive Auxinbindung darstellt. Die Auswertung der SCATCHARD-Plots ergibt im Fall der kompetitiven Hormonbindung eine hohe Affinität und eine geringe Kapazität, d.h. begrenzte Anzahl der Bindungsstellen. Dagegen ist die nichtkompetitive Bindung charakterisiert durch eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Bindungsstellen mit einer sehr niedrigen Affinität. Die biphasischen Kurven des SCATCHARD-Plots werden in der Literatur als das Vorkommen entweder von verschiedenen Auxinbindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten oder von einer Auxinbindungsstelle mit negativer Kooperativität, d.h. Abnahme der Affinität der Bindungsstelle mit zunehmender Auxinkonzentration, interpretiert.

MURPHY (1980) hat diese Interpretation von Auxinbindungsdaten kritisiert und aufgrund von eigenen Versuchen und Computerberechnungen dazu vermutet, daß das Vorkommen von Auxinbindungsstellen mit niedriger Affinität auf der unspezifischen Verteilung von Auxin in der lipophilen Region der Mem-

bran beruht. Diese Erklärung der nichtkompetitiven Auxinbindung an biologischen Membranen wird mit der nachfolgenden Argumentation angezweifelt und dafür eine neue Interpretation angeboten. Die chemische Struktur, aromatisches Ringsystem mit einer Seitenkette, die eine protonendissozierende Gruppe trägt, kennzeichnet nämlich Auxine als amphipathische Substanzen, d.h. als Substanzen mit hydrophoben als auch hydrophilen Molekülbereichen. Solche amphipathischen Substanzen zeigen nach den Untersuchungen von CONRAD & SINGER (1979, 1981) ein grundverschiedenes Löslichkeitsverhalten in biologischen und in künstlichen Membranen aus Phospholipiddoppelschichten. Bei Anwendung einer drucklosen Filtrationsmethode, der hygroskopischen Desorption, ließ sich feststellen, daß die Löslichkeit von Amphipathen in biologischen Membranen um einen Faktor 10 geringer als in Wasser ist und sogar nur 10^{-4} von der in künstlichen Phospholipidmembranen beträgt. Diese Ergebnisse ließen sich von den Autoren mit der in früheren Untersuchungen allgemein verwendeten Zentrifugationsmethode nicht erzielen. Dies erklärt auch den Widerspruch zu den Aussagen früherer Untersuchungen unter Anwendung der Zentrifugationsmethode. Danach sollen kleine amphipathische Moleküle in der Phospholipiddoppelschicht biologischer Membranen gelöst vorkommen, indem ihre hydrophoben Molekülteile im Bereich der Fettsäureketten und die hydrophilen Molekülteile an der Grenzfläche der Lipiddoppelschicht zum Wasser angeordnet sein sollen. Die im Gegensatz zur hygroskopischen Desorption mit der Zentrifugation nachweisbare Bindung von Amphipathen an biologischen Membranen beruht wahrscheinlich eher auf der Ausbildung und Assoziation von Mizellen, die von den Amphipathen bei einer bestimmten kritischen Konzentration gebildet werden. Durch die Wechselwirkung mit Membranbausteinen liegt die kritische mizellare Konzentration der Amphipathen unter Umständen um mehrere Zehnerpotenzen niedriger als in einer wässrigen Phase ohne den Zusatz von Membranen. Bei Anwendung der hygroskopischen Desorption wird durch restloses Entfernen des Wassers und

der darin gelösten Amphipathen die Mizellenbildung an der biologischen Membran unmöglich. Damit beruht das mit der hygroskopischen Desorption nachweisbare Vorkommen von Amphipathen in künstlichen Phospholipiddoppelschichten nicht auf der Mizellenbildung, sondern auf tatsächlicher Löslichkeit der Amphipathen in der künstlichen Membran. CONRAD & SINGER erklären die weitgehende Unlöslichkeit von Amphipathen in biologischen Membranen als Folge eines hohen lateralen Binnendruckes dieser Membranen, der in künstlichen Phospholipiddoppelschichten nicht vorkommt. Der Binnendruck in biologischen Membranen wird offenbar durch ihre heterogene Zusammensetzung aus Phospholipiden und Proteinen hervorgerufen. Diese Hypothese konnte durch den Einbau von Proteinen in Phospholipiddoppelschichten experimentell bestätigt werden, denn die Löslichkeit vom Amphipathen verringerte sich um einen Faktor 100. Als Einschränkung für die Gültigkeit dieser Hypothese ist anzuführen, daß die Einzelheiten der molekularen Wechselwirkungen von intrinsischen Membranproteinen und Phospholipiden, die u.a. auch den lateralen Binnendruck verursachen, noch unverstanden sind (CHAPMAN et al., 1982) und daß die Mizellenbildung von Amphipathen an biologischen Membranen angezweifelt wurde (MOULES et al., 1982).

Werden diese Einwände nicht berücksichtigt, erklärt die Hypothese von CONRAD & SINGER einige Phänomene der Auxinbindung an biologischen und künstlichen Membranen. Unter der Annahme, daß Auxin als amphipathische Substanz schon bei einer sehr niedrigen Konzentration Mizellen ausbildet, ist die nichtkompetitive Auxinbindung, die bisher an biologischen Membranen und in dieser Arbeit an allen Membranfraktionen aus DC-Zellen mit der Zentrifugationsmethode nachgewiesen wurde, nichts anderes als die Bildung und Anlage von Auxinmizellen an den Membranen. In diesem Zusammenhang ist das Ergebnis interessant, daß sich an biologischen Membranen die nichtkompetitive Bindung von NPA (N-1-Naphthylphthalamidsäure), einem Auxintransportinhibitor

mit durch die Molekülstruktur gegebenen amphipathischen Eigenschaften, mit der Zentrifugations- aber nicht mit der Filtrationsmethode feststellen ließ (TRILLMICH & MICHALKE, 1979). Weiterhin konnte in einigen Untersuchungen mit verschiedenen Methoden tatsächlich nachgewiesen werden, daß Auxin als kleines amphipathisches Molekül an Phospholipidmoleküle bindet (WEIGL 1969 b,c; VEEN, 1974) und sich in Phospholipiddoppelschichten löst (WEIGL 1969 a,c; ZIMMERMANN et al., 1977; LELKES et al., 1980).

Mit der Methode der niederfrequenten Impedanz-Dispersionsmessung ließ sich feststellen, daß sich Auxinmoleküle bei niedriger Ionenstärke im polaren und bei hoher Ionenstärke im apolaren Bereich der Phospholipiddoppelschicht aufhalten und so zu einer Änderung in der elektrischen Leitfähigkeit der künstlichen Membran führen (ZIMMERMANN et al., 1977). In Abhängigkeit von der Ionenstärke treten auch auxinbedingte Änderungen der Mikroviskosität und der Phasenübergangstemperatur von Phospholipiddoppelschichten unterschiedlicher Zusammensetzung auf (LELKES et al., 1980). Es ist aber noch unklar, ob diese an sich interessanten Ergebnisse auf biologische Membranen mit ihrer Zusammensetzung aus Phospholipiden und Proteinen übertragen werden können, zumal die biologische Relevanz der Wechselwirkung von Auxin mit Phospholipiden angezweifelt wurde, da die Bindungseigenschaften der verschiedenen Substanzen nicht mit ihren biologischen Aktivitäten korrelierbar waren (VEEN, 1974).

Aus diesen Gründen ist es mehr als wahrscheinlich, daß die kompetitive Auxinbindung an biologischen Membranen wie an denen des E.R. aus DC-Zellen die biologisch relevante Hormonbindung darstellt. Da entsprechend der Hypothese von CONRAD & SINGER der Binnendruck die Löslichkeit von kleinen amphipathischen Molekülen wie Auxin in biologischen Membranen verhindert, kann die kompetitive Auxinbindung mit ihrer begrenzten Anzahl von Bindungsstellen hoher Affinität nur auf die spezifische Wechselwirkung von Auxin mit be-

stimmten Membranproteinen zurückgehen. Diese Schlußfolgerung aus der Hypothese von CONRAD & SINGER läßt sich widerspruchsfrei mit den Aussagen der Hormonrezeptorhypothese in Übereinstimmung bringen. Außerdem erfüllen die Membranproteine im Sinne der Hormonrezeptorhypothese alle Voraussetzungen für die biologische Funktion eines Hormonrezeptors:

- 1) Die Proteine besitzen aufgrund der genetisch festgelegten Aminosäuresequenz eine definierte räumliche Struktur, die die Signalerkennung ermöglicht, d.h. die Proteinkonformation garantiert die Affinität und die Spezifität der Hormonbindung.
- 2) Die Proteine sind bei Hormonbindung zur Ausführung einer bestimmten biologischen Funktion fähig, d.h. die Hormonbindung löst die hormonspezifische Primärreaktion aus.
- 3) Der Hormonrezeptor ist in einer Membran zwischen verschiedenen subzellulären Kompartimenten angeordnet und ermöglicht durch die hormonspezifische Primärreaktion eine gerichtete Beeinflussung von Funktionsabläufen in einem der Kompartimente.
- 4) Die Biosynthese von und damit die Ausstattung der Membran mit dem Hormonrezeptorprotein unterliegt einer direkten genetischen Kontrolle, d.h. die Hormonkompetenz einer Zelle ist direkt abhängig vom Prozeß der differentiellen Genexpression.

Die Wechselwirkung von Auxin mit Membranproteinen wurde schon von OSBORNE & MULLINS (1969) und seit den Auxinbindungsversuchen von HERTEL et al. (1972) bei allen weiteren Untersuchungen dieser Art von den verschiedenen Autoren vermutet (RUBERY, 1981). Diese Vermutungen wurden durchaus bestätigt, als es nach Auflösung von mikrosomalen Membranen

aus *Zea mays*-Koleoptilzellen gelang, die Auxinbindung mit hoher Affinität an den isolierten Proteinen nachzuweisen (VENIS, 1977, 1980; CROSS & BRIGGS, 1978, 1979). Auch konnte die Eigenschaft der hochaffinen Auxinbindung an isolierten cytoplasmatischen Proteinen aus Kalluszellen von *Nicotiana tabacum* festgestellt werden (OOSTROM et al., 1975, 1980). Dennoch ist es bis jetzt ungeklärt, ob diese an bestimmten Membranfraktionen oder an isolierten Proteinen nachgewiesenen hochaffinen Auxinbindungsstellen tatsächlich die nativen Auxinrezeptoren sind, da sich bei all diesen Bindungsstellen eine auxinkontrollierte Primärreaktion nicht finden ließ (RUBERY, 1981). Zudem könnten die Auxinbindungsstellen nur den Nachweis von Proteinen mit der zufälligen Bindungseigenschaft für Auxin darstellen, da das Hormon von Rinder-serumalbumin mit ähnlicher Charakteristik gebunden wird (MURPHY, 1979). In dieser Situation war es zur Bewertung der biologischen Relevanz der an E.R.-Membranen aus DC-Zellen lokalisierten Auxinbindung unbedingt notwendig, ihre physikochemischen Eigenschaften sowie die von ihr vielleicht ausgelöste Primärreaktion zu charakterisieren.

Aufgrund von Untersuchungen über die chemische Struktur von Auxinen unterschiedlicher biologischer Aktivität haben KATEKAR (1979) und FARRIMOND et al. (1981) neuere theoretische Vorstellungen entwickelt, die die Wechselwirkung des Auxinmoleküls mit dem Bindungsbereich des hypothetischen Auxinrezeptors betreffen. Es wird angenommen, daß auch die Hormonbindung in der thermodynamisch günstigen perpendicularen Konformation des Auxins stattfindet, d.h. in einer Konformation, bei der die Substituenten an den Kohlenstoffatomen der Seitenkette senkrecht zum planaren Ringsystem des Auxinmoleküls ausgerichtet sind. Der Bindungsbereich des Hormonrezeptors ist mit physikochemisch komplementären Eigenschaften im Vergleich zum Auxinmolekül ausgestattet und setzt sich u.a. aus einem Elektronen- und einem Carboxyl-

akzeptor zusammen. Der Elektronenakzeptor reagiert elektrophil und bildet mit den π -Elektronen des aromatischen Ring-systems von Auxinen eine nichtkovalente Bindung aus, deren Bindungsstärke vielleicht die biologische Aktivität des einzelnen Hormons bestimmt. Für das Vorkommen des Elektronenakzeptors im Bindungsbereich des Auxinrezeptors in E.R.-Membranen aus DC-Zellen spricht auch die Hemmung der Auxinbindung durch Azid-Ionen. Da das Azid-Anion ein lineares Molekül mit delokalisierten π -Elektronen ist, reagiert es wie das aromatische Ringsystem des Auxins mit dem Elektronenakzeptor. Diese Azidhemmung der hochaffinen Auxinbindung wurde auch am isolierten Auxinbindungsprotein aus *Zea mays* gefunden und als eine kompetitive Hemmung mit einem $K_i = 4 \text{ mmol l}^{-1}$ charakterisiert (CROSS & BRIGGS, 1979).

Entsprechend dem Phänomen, daß die kompetitive Auxinbindung an E.R.-Membranen aus DC-Zellen in Anwesenheit von wenig polaren organischen Lösungsmitteln wie Ethanol nicht nachzuweisen ist, stimmen die physikochemischen Eigenschaften der kompetitiven und ethanolsensitiven Auxinbindung gut überein. So ist die Auxinbindung pH-abhängig und erfolgt in dem Bereich zwischen pH 5.0 und pH 8.0. Dabei verschiebt sich das pH-Optimum der Hormonbindung von pH 5.5 bei der ethanolsensitiven Auxinbindung auf pH 6.5 bis pH 7.5 bei der kompetitiven Auxinbindung, wenn Ca^{2+} in millimolarer Konzentration vorhanden ist. Dies bedeutet, da Auxine schwache Säuren sind, daß das Auxinmolekül in der dissoziierten Form, d.h. als Anion an der Bindungsstelle gebunden wird. Dieses Ergebnis entspricht auch den Vorstellungen von KATEKAR (1979) über die Wechselwirkung der geladenen Carboxylgruppe des Auxins mit dem Carboxylakzeptor, die eine Voraussetzung für die nichtkovalente Bindung zwischen dem aromatischen Ringsystem des Auxins und dem Elektronenakzeptor des Auxinrezeptors ist. Daß Auxin als Anion an natürlichen Membranen gebunden wird, steht im klaren Gegensatz zur bevorzugten Bindung des Hormons in seiner protonierten Form

an künstlichen Phospholipidmembranen (KENNEDY & HARVEY, 1972). Dies unterstreicht auch noch einmal entsprechend der Hypothese von CONRAD & SINGER (1979, 1981) den Unterschied in der Wechselwirkung von kleinen amphipathischen Molekülen mit natürlichen und künstlichen Membranen. Die pH-Abhängigkeit der kompetitiven Auxinbindung wurde auch an isolierten Membranfraktionen aus anderen Objekten festgestellt. Dabei liegen die pH-Optima der Auxinbindung bei *Nicotiana tabacum* mit pH 5.0 (VREUGDENHIL et al., 1979), bei *Zea mays* mit pH 5.5 (BATT & VENIS, 1976; RAY et al., 1977a) und bei *Pisum sativum* mit pH 6.5 (JABLANOVIĆ & NOODÉN, 1974) in einem mit dem von DC-Zellen vergleichbaren pH-Bereich. Nur die kompetitive Auxinbindung an Membranfraktionen aus Zellen verschiedener Früchte weist einheitlich ein wesentlich saureres pH-Optimum bei pH 4.0 auf (MUDGE, 1980; NARAYANAN et al., 1981 a, b). Auch wenn das Auxinmolekül als Anion an den Hormonrezeptor des E.R. aus DC-Zellen bindet, entspricht die Auxinbindung doch nicht einer Ionenbindung, denn sie wird von Veränderungen der Ionenstärke kaum beeinflusst. Nur in Anwesenheit von zweiwertigen Metallkationen wird die kompetitive Auxinbindung von K^+ -Konzentrationen ab 100 mmol l⁻¹ gehemmt. Einwertige Metallkationen wirkten auch auf die hochaffine Auxinbindung an mikrosomalen Membranen von *Zea mays* entweder nicht (RAY et al., 1977a) oder nur leicht hemmend (POOVAIAH & LEOPOLD, 1976).

Die kompetitive Auxinbindung an der E.R.-Membran aus DC-Zellen reagiert äußerst empfindlich auf die Anwesenheit schon geringer Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln, die aber mit Wasser ohne Bildung einer eigenen Phase gut mischbar sind. Dabei nimmt die Empfindlichkeit der Hormonbindung gegenüber dem Lösungsmittel innerhalb der Reihe Dimethylsulfoxid < Dimethylformamid = Acetonitril < Ethanol zu. Dies bedeutet, daß mit abnehmender Dielektrizitätskonstante, d.h. mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels die hochaffine Auxinbindung zurückgeht. Eine derartige

Empfindlichkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln wurde auch bei der hochaffinen Auxinbindung an der E.R.-Membran aus Mesokotylzellen von *Zea mays* beobachtet (WALTON & RAY, 1981). Dieser Rückgang der hochaffinen Auxinbindung läßt sich mit der Wirkung der wenig polaren organischen Lösungsmittel auf die Fluidität von biologischen Membranen erklären. Nach dem "Flüssig-Mosaik-Membran"-Modell von SINGER & NICOLSON (1972) sind biologische Membranen als eine zweidimensionale Lösung von Proteinen in einer relativ flüssigen Lipiddoppelschicht anzusehen. Die Fluidität der Membran ist sowohl von der Lipidzusammensetzung als auch von Umgebungsfaktoren wie z.B. der Ionenkonzentration, dem pH und der Temperatur abhängig. Die Proteine, die sich als intrinsische Moleküle durch die gesamte Lipiddoppelschicht erstrecken oder als periphere Moleküle nur in deren Oberfläche eintauchen, werden in ihrer Funktion von der Fluidität der Lipide in ihrer Umgebung kontrolliert (SANDERMANN, 1978). Diese Vorstellung gilt auch für Membranproteine mit der Funktion von Hormonrezeptoren (SINGER & NICOLSON, 1972; CUATRECASAS, 1974; KAHN, 1976).

Auch die hochaffine Hormonbindung an der Auxinbindungsstelle ist von einem bestimmten Fluiditätszustand der E.R.-Membran abhängig, da sie nur in Anwesenheit von Dimethylsulfoxid (DMSO) aber nicht von Ethanol nachzuweisen ist, und diese Substanzen auf die Fluidität von Phospholipidmembranen unterschiedlich wirken. Kurzkettige, aliphatische Alkohole (C_1 - C_4) erhöhen bei dem im Hormonbindungstest verwendeten Konzentrationsbereich die Fluidität von künstlichen Phospholipidmembranen (PATERSON et al., 1972; VANDERKOOI et al., 1977) und auch in einem geringeren Ausmaß von biologischen Membranen (CURRAN & SEEMAN, 1977; NANDINI-KISHORE et al., 1979). Dabei wirkt Ethanol offenbar im äußeren Bereich des hydrophoben Anteils der Phospholipiddoppelschicht (HUI & BARTON, 1973; LENAZ et al., 1976). Dagegen verringert DMSO die Fluidität von biologischen wie auch von künstlichen

Membranen, die sich aus sauren aber nicht aus neutralen Phospholipiden aufbauen. Für diese stabilisierende Wirkung von DMSO auf Phospholipidmembranen wird angenommen, daß DMSO entweder über Wechselwirkungen mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide eine eingeschränkte Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten und damit eine erhöhte Packungsdichte der Phospholipide bewirkt oder über Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen in diesem Bereich eine dem Eiswasser ähnliche Struktur aufbaut (LYMAN et al., 1976).

Für einen bestimmten Fluiditätszustand der E.R.-Membran als Voraussetzung für die Auxinbindung sprechen auch zwei weitere Phänomene. Ein bestimmter osmotischer Wert des Inkubationsmediums, entsprechend einer Saccharosekonzentration von mehr als 100 mmol l^{-1} , ermöglicht erst die hochaffine Auxinbindung an die zu Vesikeln geschlossenen E.R.-Membranen aus DC-Zellen. Nach den Untersuchungen von BOROCHOV & BOROCHOV (1979) ist anzunehmen, daß sich bei diesem osmotischen Wert das Vesikelvolumen durch Wasserefflux so reduziert, daß die Verkleinerung der Vesikeloberfläche eine höhere Packungsdichte der Phospholipide und damit eine geringere Fluidität der E.R.-Membran bewirkt. Dabei stimmen die Saccharosekonzentrationen, die die Auxinbindung an den Bindungsstellen der E.R.-Membranen aus DC-Zellen ermöglichen mit denen überein, die in den Zellen von *in vitro* kultivierten Wurzelexplantaten von *Daucus carota* bestimmt wurden (CRAVEN et al., 1972). Weiterhin geht bei Anwesenheit des nicht-ionischen Detergenz TRITON-X-100 in einem Konzentrationsbereich, der noch nicht ausreicht, intrinsische Membranproteine aus der Membran zu lösen, die Membraneigenschaft der Auxinbindung verloren. Eine solche TRITON-Wirkung wurde auch auf die Auxinbindung an E.R.-Membranen aus *Zea mays* festgestellt (RAY et al., 1977a). Die TRITON-Wirkung selbst beruht wahrscheinlich auf der Einlagerung von TRITON-Molekülen in der E.R.-Membran und dadurch dort hervorgerufenen Fluiditätsänderungen.

Die offensichtlich von der Membranfluidität kontrollierte Auxinbindung an der E.R.-Membran aus DC-Zellen ist innerhalb eines bestimmten Temperaturbereiches nicht temperaturempfindlich, sondern temperaturabhängig sowie durch mehrwertige Metallkationen stimulierbar. Mit diesen Eigenschaften unterscheidet sich diese Auxinbindung wesentlich von der, die an unterschiedlichen Membranfraktionen bei anderen pflanzlichen Objekten nachgewiesen wurde. Zum Beispiel findet nach den Untersuchungen von RAY et al. (1977a) die Auxinbindung am E.R. aus Koleoptilzellen von *Zea mays* schon bei $\pm 0^{\circ}\text{C}$ optimal statt, ist temperaturempfindlich und wird von Mg^{2+} oder Ca^{2+} kaum beeinflusst. Dagegen fand POOVAIAH & LEOPOLD (1976) in einer nicht näher definierten Membranfraktion des gleichen Objektes eine Stimulation der Auxinbindung durch mehrwertige Metallkationen. Die Auxinbindung an mikrosomalen Membranen aus Kalluszellen von *Nicotiana tabacum* zeigt eine Temperaturabhängigkeit mit einem Temperaturoptimum bei $+35^{\circ}\text{C}$ aber keine Stimulation durch mehrwertige Metallkationen (VREUGDENHIL et al., 1979). Nur die von JABLANOVIĆ & NOODÉN (1974) beschriebene Auxinbindung an mikrosomalen Membranen aus Sproßknospen von *Pisum sativum*-Keimlingen gleicht mit ihrer Temperaturabhängigkeit und auch Ca^{2+} -Stimulation den physikochemischen Eigenschaften der Auxinbindung an der E.R.-Membran aus DC-Zellen.

Wie läßt sich nun auf molekularer Ebene die Stimulation der Auxinbindung durch mehrwertige Metallkationen sowie bei Temperaturerhöhung erklären? Eine Erklärungsmöglichkeit bieten die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen, die zeigen, daß mehrwertige Metallkationen, insbesondere Ca^{2+} , die Fluidität von künstlichen und auch biologischen Phospholipidmembranen erniedrigen (JACOBSON & PAPAHAJDJOPOULUS, 1975; BOSS & MOTT, 1980; LEGGE et al., 1982). Diese Wirkung beruht wahrscheinlich auf der Bindung des Kations an die Phosphatgruppen der Phospholipide bei einer gleichzeitigen Verdrängung von Wassermolekülen aus diesem Bereich, so daß

es zu einer erhöhten Packungsdichte der Phospholipide in der Membran kommt (HAUSER et al., 1977). Dabei erniedrigt Ca^{2+} die Fluidität von pflanzlichen Membranen, ohne den Phasenzustand der Phospholipidmembran zu verändern. Dennoch finden Auswirkungen auf den hydrophoben Bereich der Phospholipiddoppelschicht statt, so daß die Funktion von intrinsischen Membranproteinen beeinflusst werden kann (LEGGE et al., 1982). Gegen eine Interpretation, daß die Ca^{2+} -Stimulation der Auxinbindung ausschließlich auf dem Mechanismus der Ca^{2+} bedingten Erniedrigung der Membranfluidität beruht, spricht allerdings das Phänomen der Temperaturabhängigkeit der Auxinbindung, denn eine Temperaturerhöhung führt bei pflanzlichen genauso wie bei tierischen Phospholipidmembranen zu einer Erhöhung der Membranfluidität (BOROCHOV et al., 1976; SHINITZKY & INBAR, 1976). Im Gegensatz zu den Befunden bei Membranen von Säugetierzellen konnten LEGGE et al., (1982) bei Temperaturen zwischen $+10^{\circ}\text{C}$ und $+50^{\circ}\text{C}$ einen Phasenübergang von einer gelartigen zu einer flüssigkristallinen Struktur in mikrosomalen Membranen aus Pflanzenzellen nicht feststellen. Die Membranen lagen ausschließlich im flüssigkristallinen Zustand vor, auch wenn, wie schon erwähnt, millimolare Konzentrationen von Ca^{2+} die Membranfluidität verringerten. Entsprechend können pflanzliche Phospholipidmembranen ihre Funktion über einen weiten Temperaturbereich aufrechterhalten (SHINITZKY & HENKART, 1979). Eine solche Membranfunktion ist offensichtlich auch die Auxinbindung an der E.R.-Membran von DC-Zellen. Die Stimulation der Auxinbindung bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration sowie der Temperatur läßt sich aufgrund der gegensätzlichen Wirkung dieser Faktoren auf die Membranfluidität nur mit dem Vorkommen einer durch Ca^{2+} stimulierbaren und temperaturabhängigen Reaktion in der Membran erklären. Nach den experimentellen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird diese Reaktion wahrscheinlich von dem Enzym Phospholipase D (EC 3.1.4.4) durchgeführt. Dies bedeutet, daß die Aktivität der Phospholipase D die Voraussetzung für die hochaffine

Auxinbindung und die auxinkontrollierte Primärreaktion an der E.R.-Membran von DC-Zellen ist. Auf die Eigenschaften und die physiologische Funktion des Enzyms wird im Zusammenhang mit der vermuteten Primärreaktion des Auxins näher eingegangen.

Wie die Diskussion schon im einzelnen gezeigt hat, unterscheidet sich die hochaffine Auxinbindung am E.R. von DC-Zellen in einigen Eigenschaften wesentlich von der Hormonbindung, die an verschiedenen subzellulären Membranfraktionen bei anderen Objekten *in vitro* nachgewiesen wurde. Damit stellt sich die Frage nach der möglichen Funktion der am E.R. lokalisierten hochaffinen Auxinbindung in der DC-Zelle. Für eine vorläufige Beantwortung dieser Frage werden hier die Vorstellungen über die Funktion der hochaffinen Auxinbindungsstellen an definierten Membranfraktionen aus der Koleoptile von *Zea mays*, dem nach der vorhandenen Literatur augenblicklich am besten charakterisierten experimentellen System der *in vitro*-Auxinbindung, berücksichtigt. Auch wenn die physiologische Relevanz der hochaffinen Auxinbindung an den *mikrosomalen* Membranen aus den Koleoptilen bei *Zea mays* von MURPHY (1980) und neuerdings von FIRN & KEARNS (1983) angezweifelt wird, lassen sich die Ergebnisse der mehrjährigen Untersuchungen von HERTEL und seinen Mitarbeitern in der Weise interpretieren, daß die nachgewiesenen Auxinbindungsstellen am Plasmalemma, E.R. und Tonoplasten nur bei einem funktionellen Zusammenwirken das physiologisch relevante Wirkungssystem der Zelle für Auxin bilden. Dieses Wirkungssystem für Auxin setzt sich nämlich aus verschiedenen Typen von Auxinbindungsstellen zusammen, die entsprechend den Funktionen des Auxintransports oder der Primärwirkung des Hormons an unterschiedlichen Membranen der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Die Bindungsstelle am Plasmalemma, von den Autoren als Auxinbindungsstelle III bezeichnet, ist offensichtlich am Mechanismus des polaren Transports von Auxin beteiligt (JACOBS & HERTEL, 1978; HERTEL et al., 1983). Dagegen wird angenommen, daß die intra-

zellulären Hormonbindungsstellen am E.R. (Auxinbindungsstelle I) und am Tonoplasten (Auxinbindungsstelle II) die Primärwirkung des Hormons auslösen (RAY, 1977; RAY et al., 1977b; DOHRMANN et al., 1978). Auf der Grundlage dieser Untersuchungen bei *Zea mays* deutet die intrazelluläre Lokalisation der hochaffinen Auxinbindung am E.R. von DC-Zellen auf die Funktion der Bindungsstellen, die Primärwirkung des Hormons zu kontrollieren. Diese Vermutung konnte in dieser Arbeit auch experimentell bestätigt werden, da sich *in vitro* eine Auxinwirkung an den isolierten Membranen des E.R. nachweisen ließ.

Als Folge eines möglichen Vorkommens des nach LORD et al. (1973) für das E.R. charakteristischen Markerenzym, der Antimycin-A resistenten Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.2.3) am Tonoplasten (LEIGH, R.A., unveröffentlicht; s. MARTY et al., 1980) kann nicht ausgeschlossen werden, daß die hochaffine Auxinbindung in DC-Zellen nicht nur am E.R. sondern auch am Tonoplasten lokalisiert ist, zumal nach den Vorstellungen u.a. von MARTY (1978) die Vakuolen von bestimmten Regionen des E.R. gebildet werden. Folglich sollten in zukünftigen Untersuchungen isolierte Tonoplasten aus DC-Zellen auf das Vorkommen von hochaffinen Auxinbindungsstellen überprüft werden. Auch andere, für Hormonrezeptoren wesentliche Eigenschaften müssen in weiteren Untersuchungen charakterisiert werden. Dazu gehören die Kinetik der Auxinbindungsreaktion, die Spezifität der Auxinbindung gegenüber biologischen aktiven und inaktiven Auxinderivaten sowie die Modulation in der Anzahl der Auxinbindungsstellen im Verlauf von Wachstums- und Differenzierungsprozessen der DC-Zellen. Schließlich sollte die strukturelle Identität und die funktionelle Kopplung von Auxinbindung und Auxinwirkung geklärt werden.

4.2. Eigenschaften der Protonenpumpe am E.R.

Der zweite experimentelle Ansatz, der im Zusammenhang mit dem Ansatz der Hormonrezeptorhypothese Hinweise auf die mögliche Primärreaktion des Auxins in DC-Zellen ergab, leitet sich von der Hypothese der Auxinregulation des H^+ -Efflux in Pflanzenzellen ab. Diese Hypothese wurde 1971 von CLELAND sowie von HAGER und seinen Mitarbeitern unabhängig voneinander aufgestellt. CLELAND (1971) gelangte in einem Übersichtsartikel über die Zellwanddehnung zu dieser Aussage, während HAGER et al. (1971) die Hypothese zur Interpretation von Ergebnissen formulierte, die sie bei einer umfangreichen physiologischen Untersuchung des auxin- und des säureinduzierten Streckungswachstums von *Helianthus*-Hypokotylen erhielten. In ihrem experimentellen System konnten HAGER et al. das säure- und das auxininduzierte Streckungswachstum unterscheiden und dadurch das gemeinsame Prinzip ihrer Wirkung, eine erhöhte extrazelluläre H^+ -Konzentration, erkennen. Dabei scheint Auxin als Effektor einer am Plasmalemma lokalisierten Protonenpumpe zu wirken, die die Protonen unter Verwendung von im Atmungsprozeß gewonnener Energie (ATP) aus dem Cytoplasma in die Zellwand aktiv verlagert. Der Ausgleich der elektrischen Ladung des H^+ -Efflux soll entweder durch einen Influx von Metallkationen (z.B. K^+ / H^+ -Austausch) oder durch einen Efflux von Anionen erfolgen. Die Ansäuerung soll die Struktur der Zellwand lockern und damit ihre plastische Dehnbarkeit erhöhen, so daß bei einem hohen Turgor der Zelle ihre Streckung ermöglicht wird.

Inzwischen wurden wesentliche Aussagen dieser Hypothese experimentell bestätigt, so z.B. der H^+ / K^+ -Austausch (HASCHKE & LÖTTGE, 1973; CLELAND, 1976), die Turgorerhöhung über den Mechanismus der CO_2 -Fixierung durch Phosphoenolpyruvatcarboxylase (EC 4.1.1.31) und anschließender Malatsynthese (HASCHKE & LÖTTGE, 1975, 1977; STOUT et al., 1978)

und die auxininduzierte Erhöhung der Zellwandplastizität (CLELAND & RAYLE, 1978; MASUDA, 1978). Zur Erklärung der lag-Phase des auxininduzierten H^+ -Efflux, seiner Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen der Proteinsynthese und des Problems der Oberflächenzunahme des Plasmalemma bei einer Volumenvergrößerung der Zelle durch das Streckungswachstum schlug RAY (1977) eine Veränderung der Hypothese vor, den sogenannten "bucket-brigade-mechanism". Danach soll Auxin nicht eine am Plasmalemma, sondern eine am E.R. lokalisierte Protonenpumpe stimulieren. Die im E.R.-Lumen angereicherten Protonen sollen in vom E.R. gebildeten Vesikeln verpackt werden. Diese E.R.-Vesikel wandern durch das Cytoplasma, fusionieren mit dem Plasmalemma und geben dabei ihre Protonen in die Zellwandmatrix ab. Doch sind weder die vermutete Primärreaktion des Auxins, die Auxinregulation der Protonenpumpe, in biochemischen Untersuchungen noch der Transport von Protonen enthaltenden E.R.-Vesikeln mit histochemischen Methoden nachgewiesen worden, so daß CLELAND (1980) den Erkenntnisstand hinsichtlich der Primärreaktion des Auxins wie folgt einschätzte:

"... In summary, we must note that after 50 years we still do not know the mechanism of auxin action. The current theory, the acid-growth theory, has already enjoyed a longer than useful lifetime and seems to be getting stronger each year. But it does not explain all aspects of auxin-induced cell elongation, and the mechanism by which auxin causes proton excretion is far from understood."

In dieser Situation waren einige Hinweise in der Literatur der Anlaß, die Hypothese der Auxinregulation des H^+ -Efflux für die Untersuchung der Primärreaktion des Auxins in DC-Zellen anzuwenden, denn eine Regulation von Ionentransportvorgängen durch Phytohormone wurde nicht nur an isolierten pflanzlichen Organen wie Koleoptil-, Hypokotyl- und Epikotylsegmenten (VAN STEVENINCK, 1976), sondern auch an isolier-

ten und *in vitro* kultivierten Pflanzenzellen beobachtet. So wurde an Zellen von *Petroselinum sativum* in Suspensionskultur eine Auxinstimulation des Cl^- -Efflux nachgewiesen und der Cl^- -Efflux entsprechend der Hypothese des auxinstimulierten H^+ -Efflux als Ausgleich der elektrischen Ladung eines H^+ -Efflux der Zellen interpretiert (BENTRUP et al., 1973). In einer weiteren Untersuchung der Ionentransportvorgänge dieser Zellen konnte eine Auxinstimulation des Fluxes von Na^+ , K^+ und Cl^- aber nicht von H^+ gemessen werden. Dennoch wurde unter der Annahme eines komplexen Mechanismus des Ionenflux am Plasmalemma die Möglichkeit der Auxinstimulation einer Protonenpumpe nicht ausgeschlossen (PFRÖNER & BENTRUP, 1978). Auch an Zellen in Suspensionskulturen von *Acer pseudoplatanus*, *Lolium perenne* und *Phaseolus vulgaris* ließ sich eine Auxinstimulation des H^+ -Efflux nicht nachweisen (FISHER & ALBERSHEIM, 1974). Dagegen wurde eine Erhöhung des H^+ -Efflux durch Auxin bei suspendierten Protoplasten von *Vicia faba* (BAYER & SÖNKA, 1976) und bei solchen von *Helianthus annuus* und *Pisum sativum* (BÜTTGER et al., 1978) gefunden. Die bisher eindeutigsten Hinweise für die Bedeutung der Hypothese des auxinstimulierten H^+ -Efflux zur Aufklärung der Primärreaktion des Auxins und von *in vitro* kultivierten Pflanzenzellen finden sich in einer Untersuchung von KURKDJIAN et al. (1982) an Suspensionskulturen von *Acer pseudoplatanus*: Bei Zusatz von Auxin reagierten die Zellen mit einer Erhöhung des H^+ -Efflux und einer gleichzeitig verstärkten Malatsynthese in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zum H^+ -Efflux. Augenblicklich liegt keine Untersuchung des H^+ -Efflux von DC-Zellen vor, doch die Ergebnisse dieser Arbeit, der Nachweis einer am E.R. lokalisierten Protonenpumpe in den Zellen, lassen vermuten, daß sich DC-Zellen vielleicht unter Nutzung des "bucket-brigade-mechanism" durchaus wie andere *in vitro* kultivierte Pflanzenzellen hinsichtlich des H^+ -Efflux verhalten könnten.

Das Vorkommen und die Eigenschaften der Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen wurde mit der Neutralrotmethode nach HAGER et al. (1980) festgestellt. Dabei wird, wie schon im Abschnitt "Versuche und Ergebnisse" ausführlich beschrieben, der energieabhängige Aufbau eines Protonengradienten über die Membran (ΔpH) durch photometrische Messung von Differenzspektren des pH-Indikators Neutralrot nachgewiesen. Die Anwendbarkeit dieser Methode bedeutet, daß die E.R.-Membranen in der Form von Vesikeln vorliegen und dabei eine geringe passive Permeabilität für Protonen besitzen. Die Orientierung zumindestens eines Teiles der E.R.-Membranen entspricht der in der Zelle, d.h. die Außenseite der Vesikelmembran ist die cytoplasmatische Seite der E.R.-Membran. Damit liegen diese E.R.-Vesikel in der nativen Form von "right-side-out"-Vesikeln vor, und in Anwesenheit des Energiesubstrats ATP wird durch die Aktivität der membrangebundenen Protonenpumpe eine energieabhängige Ansäuerung des E.R.-Lumens wie in der Zelle möglich. Mit dem Zusatz von protonophoren Substanzen verschwindet die Absorptionsänderung im Differenzspektrum von Neutralrot, so daß die gemessene Absorptionsänderung tatsächlich durch die intravesikuläre Ansäuerung hervorgerufen wird und nicht als Folge von unspezifischer Bindung von Neutralrotmolekülen an der Vesikelmembran auf dem Phänomen der Metachromasie beruht. Dieses experimentelle System hat gegenüber dem üblichen ATPase-Test mit dem Nachweis von hydrolytisch freigesetztem Orthophosphat den Vorteil, daß ausschließlich die Eigenschaften der Protonenpumpe aber nicht die von anderen phosphatfreisetzenden Enzymen an der E.R.-Membran gemessen werden und ermöglichte erst dadurch den komplexen Mechanismus der Auxinstimulation der Protonenpumpe aufzuklären.

Nach den Untersuchungen mit der Neutralrotmethode zeichnet sich die Protonenpumpe am E.R. durch eine ausgesprochene Spezifität zum Energiesubstrat $Mg \cdot ATP$ aus und kann dement-

sprechend eine andere Kombination von Nukleosidtriphosphaten und zweiwertigen Metallkationen sowie $Mg \cdot ATP-\gamma-S$ oder $Mg \cdot ADP$ als Energiesubstrat zum Aufbau eines Protonengradienten über die Membran (ΔpH) nicht nutzen. Diese Eigenschaften kennzeichnen das für die Protonentranslokation am E.R. verantwortliche Enzym als eine Mg^{2+} -abhängige Adenosintriphosphatase (Mg^{2+} -ATPase: EC 3.6.1.3). Damit stellt sich die Frage nach dem Struktur- und Funktionstyp dieser ATPase, denn in den Zellen der Organismen kommen mindestens zwei grundsätzlich verschiedene Typen von membrangebundenen ATPasen vor.

Der erste Enzymtyp betrifft die Kationen-translozierenden ATPasen (HOBBS & ALBERS, 1980). Dieser Enzymtyp weist einen relativ einfachen Aufbau aus bis zu drei Polypeptid-Untereinheiten auf, und die für dieses Enzym charakteristische und größte Untereinheit hat eine durchschnittliche Molekularmasse von 100 000 Dalton. Während der ATP-Hydrolyse wird das freigesetzte Orthophosphat am Enzym kovalent gebunden, d.h. im Enzymmechanismus tritt ein intermediärer Phosphorylierungsschritt auf. In Anwesenheit von Orthovanadat wird dieser Phosphorylierungsschritt blockiert, da Vanadat aufgrund seiner dem Phosphat ähnlichen Raumstruktur an der Phosphatbindungsstelle des Enzyms mit hoher Affinität gebunden wird (LOPEZ et al., 1976). Folglich zeichnen sich alle Enzyme dieses Typs durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Orthovanadat aus. DAME & SCARBOROUGH (1981) haben ein gemeinsames Funktionsprinzip im Enzymmechanismus der Kationen-translozierenden ATPasen erkannt und es in der folgenden Hypothese formuliert: Die ATP-Hydrolyse führt zu einer Freisetzung von Protonen im aktiven Zentrum, und dieses örtlich begrenzte elektromotorische Potential ist die Triebkraft für die Kationentranslokation der einzelnen ATPasen. Zu diesem Enzymtyp gehören am Plasmalemma von Tier- und Pflanzenzellen die Na^{+}/K^{+} -ATPase (GLYNN & KARLISH, 1975; LINDBERG, 1982) und die Ca^{2+} -ATPase (SARKADI, 1980; GROSS

& MARME, 1978; DIETER & MARME, 1980), am sarkoplasmatischen Retikulum die Ca^{2+} -ATPase (IKEMOTO, 1982) in der Mucosa der Magenschleimhaut die $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase (WALLMARK et al., 1980), am Plasmalemma von Bakterien die $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase (EPSTEIN & LAIMINS, 1980), und die H^{+} -ATPase am Plasmalemma von Pilzzellen (GOFFEAU & SLAYMAN, 1981) und von Zellen höherer Pflanzen (BRISKIN & LEONARD, 1982; BRISKIN & POOLE, 1983; SCALLA et al., 1983; VARA & SERRANO, 1983).

Der zweite Enzymtyp der membrangebundenen ATPasen umfaßt die Enzyme der $\text{F}_0\text{-F}_1$ -ATPasen oder Kopplungsfaktoren-ATPasen und kommt in Membranen von Bakterien (DUNN & HEPPEL, 1981), Chloroplasten (SHAVIT, 1980), Mitochondrien (SENIOR, 1979) und offensichtlich als modifizierter Typ in tierischen Zellen an intrazellulären Membranen von Vesikeln mit exocytotischer Funktion vor (APPS & SCHATZ, 1979; CIDON & NELSON, 1983). Diese Enzyme setzen sich aus einem intrinsischen Protein, dem F_0 -Teil, und einem peripheren Protein, dem F_1 -Teil, zusammen. Beide Teile werden von mehreren unterschiedlichen Polypeptiden aufgebaut, deren Funktionen sich durch spezifische Hemmstoffe blockieren lassen. Die gesamte $\text{F}_0\text{-F}_1$ -ATPase baut sich aus bis zu 10 verschiedenen Polypeptiden auf, so daß das Enzym eine entsprechend hohe Molekularmasse mit 350 000 - 450 000 Dalton aufweist. Bei Assoziation des F_1 - an den F_0 -Teil kann das gekoppelte Enzym einen bestehenden Protonengradienten über die Membran (ΔpH) zur ATP-Synthese verwenden und anderenfalls die ATP-Hydrolyse zum Aufbau eines Protonengradienten (ΔpH) nutzen. Der F_0 -Teil ist für die Funktion der Protonentranslokation und der F_1 -Teil für die der ATP-Synthese bzw. der ATP-Hydrolyse verantwortlich. Im Enzymmechanismus der $\text{F}_0\text{-F}_1$ -ATPase tritt kein intermediärer Phosphorylierungsschritt auf, und entsprechend zeigt das Enzym keine Empfindlichkeit gegenüber Orthovanadat.

Für die H^+ -ATPase der E.R.-Protonenpumpe liegen zwar noch keine Untersuchungen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Untereinheiten und ihrer Molekularmasse vor, doch ermöglichen die Ergebnisse der Hemmstoffversuche eine Zuordnung des Enzyms zum Struktur- und Funktionstyp der $F_0 \cdot F_1$ -ATPase. Dieser Zuordnung entspricht zunächst das Fehlen einer Empfindlichkeit gegenüber Orthovanadat, dem spezifischen Hemmstoff der Kationen-translozierenden ATPasen auch bei höheren Pflanzen (COCUCCI et al., 1980; BRISKIN & LEONARD, 1982; BRISKIN & POOLE, 1983; SCALLA et al., 1983). Dagegen wird die Aktivität der E.R.-Protonenpumpe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) und Organozininderivaten, Hemmstoffen der Protonen-translokation am Proteolipid der $F_0 \cdot F_1$ -ATPasen, blockiert. Zwar hemmt DCCD auch protonentranslozierende ATPasen vom Typ der vanadatsensitiven Kationen-translozierenden ATPasen (BOWMAN et al., 1978; GOFFEAU & SLAYMAN, 1981), doch werden diese Enzyme offenbar nicht von Organozininderivaten gehemmt (DELHEZ et al., 1977). Für die genannte Zuordnung spricht auch die Empfindlichkeit der E.R.-Protonenpumpe gegenüber Oligomycin, dem spezifischen Hemmstoff der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase. Dabei ist es auffallend, daß selbst hohe Konzentrationen von Oligomycin die Protonenpumpe am E.R. nicht völlig hemmen. Im Vergleich zur mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase ist diese geringere Oligomycinempfindlichkeit vielleicht die Folge einer veränderten Zusammensetzung und Anordnung der Untereinheiten in der ATPase am E.R., so daß Oligomycin im Fall des Vorkommens der spezifischen Hemmstoffbindungsstelle, des OSCP (oligomycin-sensitivity conferring protein), mit geringerer Affinität oder im Fall der Abwesenheit von OSCP unspezifisch und nichtkompetitiv am Enzym gebunden wird. Dagegen beruht die Empfindlichkeit der Protonenpumpe am E.R. gegenüber Natriumazid, das an den F_1 -Teil der mitochondrialen ATPase bindet (EBEL & LARDY, 1975) und dadurch diesen Enzymtyp aber nicht den der Kationen-translozierenden ATPase hemmt (GOFFEAU & SLAYMAN, 1981), auf einem Mechanismus, der an anderer Stelle noch diskutiert wird. Daß

die Protonenpumpe am E.R. nicht identisch mit der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase ist, zeigt, im Gegensatz zum mitochondrialen Enzym, ihre Hemmbarkeit durch Diethylstilbesterol (DES). Diese DES-Empfindlichkeit bedeutet, daß die energieabhängige Protonentranslokation am E.R. offenbar vom Membranpotential beeinflußt wird. Es ist nämlich vom DES bekannt, daß es an intakten Zellen das Membranpotential verändert (KEIFER & SPANSWICK, 1978; FELLE, 1982) und andererseits elektrogene protonentranslozierende ATPasen hemmt (BOWMAN et al., 1978; BALKE & HODGES, 1979).

Das Vorkommen dieser, der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase in der Struktur ähnlichen ATPase am E.R. von DC-Zellen steht nicht im Widerspruch zu Erkenntnissen über die Biogenese der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase in Pflanzenzellen, denn die Gene für die Untereinheiten des F_1 -Teils sowie des OSCP sind im Kerngenom lokalisiert und ihre Transkriptionsprodukte werden an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert (TZAGOLOFF & MACINO, 1979; LEAVER & GRAY, 1982). Die Erkenntnisse zur Lokalisation der Biogenese von Untereinheiten des F_0 -Teils weisen darauf hin, daß während der Evolution eine Verlagerung von Genen aus dem Mitochondrium in das Kerngenom stattgefunden hat (TZAGOLOFF & MACINO, 1979). So ist das DCCD-bindende Protein in *Saccharomyces* und in *Zea* das Produkt von mitochondrialer, bei *Neurospora* und *Xenopus* aber von nukleärer Genexpression. Nach den vorhandenen genetischen Untersuchungen zur Biogenese der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase ist es also durchaus möglich, daß die Untereinheiten des F_0 - bzw. F_1 -Teils als Genprodukte des Kerngenoms nicht nur in mitochondriale, sondern auch in cytoplasmatische Membranen wie dem E.R. eingebaut werden, zumal das für die der mitochondrialen ATPase strukturell ähnlichen ATPase in Membranen der chromaffinen Granula auch angenommen wird (APPS & GLOVER, 1978; APPS & SCHATZ, 1979).

Die Protonenpumpe am E.R. setzt sich noch aus einer weiteren Struktur und Funktion als die der protonentranslozierenden $F_0 \cdot F_1$ -ATPase zusammen, da der energieabhängige Aufbau eines mit der NR-Methode meßbaren pH-Gradienten über die Membran (ΔpH) von der stimulierenden Wirkung bestimmter monovalenter Anionen abhängig ist. Monovalente Kationen wie Li^+ , Na^+ , K^+ und Cholin $^+$ haben dagegen keine Wirkung auf die Protonentranslokation. Die Protonenpumpe zeigt in ihrer Anionenabhängigkeit bei der Ausnahme von F^- eine ausgeprägte Spezifität für Halogenidionen und andere, auch monovalente Anionen, können die stimulierende Wirkung dieser Halogenidionen nicht ersetzen bzw. wirken in deren Anwesenheit sogar hemmend. Das Fehlen der stimulierenden Wirkung von F^- beruht nicht auf einer Hemmung der H^+ -ATPase durch das Anion, wie sie für viele Phosphohydrolasen bekannt ist (MACKENZIE et al., 1980), da der Protonengradient (ΔpH) in Anwesenheit von Cl^- selbst bei hohen Konzentrationen von F^- durch das Enzym aufgebaut wird. Aus den nachfolgend angeführten Gründen kann von den auf die Protonentranslokation stimulierend wirkenden Halogenidionen Cl^- als das physiologisch relevante Anion betrachtet werden. Im Vergleich zu Br^- und J^- ist Cl^- das häufigste und das am weitesten verbreitet vorkommende Anion in Mineralien der Lithosphäre. Nach CLARKSON & HANSON (1980) wird Cl^- von der Pflanze leicht aufgenommen und reichert sich in ihr in Konzentrationen zwischen 50 und 500 $\mu mol\ g^{-1}$ Trockensubstanz an. Da Cl^- zudem ein metabolisch nahezu inertes Anion ist, wird es über einen weiten Konzentrationsbereich von der Pflanze toleriert. Die physiologische Funktion von Cl^- ist vor allem sein Ladungsausgleich gegenüber Kationen, und das Anion ist damit auch für die Osmoregulation der Zelle von wesentlicher Bedeutung.

Die Cl^- -Stimulation der Protonenpumpe am E.R. ist nicht die Folge einer die Enzymaktivität fördernden Bindung des

Anions an die $H^{\oplus}$ -ATPase, wie dies von der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase bekannt ist (EBEL & LARDY, 1975), sondern wird von einem $H^{\oplus}/Cl^{\ominus}$ -Symport an der E.R.-Membran hervorgerufen. Dieser Mechanismus konnte in Versuchen mit Substanzen, die die passive Membranpermeabilität spezifisch für $Cl^{\ominus}$ erhöhten, sowie vor allem mit spezifischen Hemmstoffen des Anionentransports durch Membranen aufgeklärt werden. So ist der energieabhängige Aufbau eines Protonengradienten über die E.R.-Membran (ΔpH) in Anwesenheit von Tripropylzinn (TPZ), einem Ionophor, das $Cl^{\ominus}$ gegen $OH^{\ominus}$ über die Membran austauscht (SELWYN et al., 1970), nicht möglich, und bei Zusatz des Ionophors wird ein schon vorhandener Protonengradient (ΔpH) schneller als bei Zusatz des Protonophors CCCP abgebaut. Selbst die Kinetik des Abbaus des Protonengradienten spricht nicht für die ausschließlich ionophore Wirkung von TPZ, denn augenblicklich kann eine zusätzliche Hemmstoffwirkung des Organozinnderivates TPZ auf die protonentranslozierende $F_0 \cdot F_1$ -ATPase der Protonenpumpe am E.R. nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund kann nur die Wirkung von Substanzen wie 4-Acetamino-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure (SITS), 4,4-Diisothiocyano-stilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS), Probenecid und Pyridoxal-5-phosphat, die nach CABANTCHIK et al. (1978) den Anionenflux durch membrangebundene Anionenkanäle spezifisch hemmen, als eindeutiger experimenteller Hinweis für den $H^{\oplus}/Cl^{\ominus}$ -Symport als Mechanismus der $Cl^{\ominus}$ -Stimulation der Protonenpumpe am E.R. gelten. Die Wirksamkeit der Hemmstoffe nimmt in der Reihe $SITS = DIDS > Probenecid > Pyridoxal-5-phosphat$ ab und bedeutet außerdem, daß der mit der energieabhängigen Protonentranslokation funktionell gekoppelte $Cl^{\ominus}$ -Transport durch einen $Cl^{\ominus}$ -spezifischen Anionenkanal in der E.R.-Membran erfolgt.

Für das Vorkommen eines solchen Anionenkanals spricht auch die ausschließliche Wirkung von Halogenidionen, als Anionen die Protonentranslokation der Protonenpumpe am E.R. zu sti-

mulieren. Dabei nimmt die Stärke des energieabhängigen Protonengradienten, und dies ist unter der Annahme einer konstanten Stöchiometrie des Proton/Halogenidionen-Symports ein Maß für den absoluten Flux der Anionen, in der Reihe $J^{\ominus} < Br^{\ominus} < Cl^{\ominus}$ zu. Diese Reihenfolge gibt die Stellung der Halogenidionen in der lyotropen Reihe wieder, in der die Ionen entsprechend der Zunahme der Hydratationsenthalpie, d.h. nach der Zunahme der elektrostatischen Feldstärke angeordnet sind. Ein weiterer Hinweis für das Vorkommen des für Halogenidionen selektiven Anionenkanals in der E.R.-Membran ergibt sich aus der Konzentrationsabhängigkeit, mit der die Anionenstimulation der Protonenpumpe erfolgt. Wie es von einem ionenselektiven Carrier in der Membran zu erwarten ist, nimmt als Folge des Protonen/Halogenidionen-Symports mit zunehmender Konzentration an Halogenidionen der pH-Gradient (ΔpH) bis zu einem Sättigungswert zu. Bei sehr hohen Konzentrationen von Halogenidionen wird die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. jedoch zunehmend gehemmt, wobei diese Hemmung in der Reihe $Cl^{\ominus} < Br^{\ominus} < J^{\ominus}$ zunimmt. Das Halogenidion $F^{\ominus}$, das die Protonenpumpe nicht stimuliert und sie in Anwesenheit von anderen Halogenidionen auch nicht hemmt, wird offenbar im Anionenkanal nicht gebunden und folglich auch nicht transportiert. Für $N_3^{\ominus}$, das die Protonenpumpe auch nicht stimuliert aber sie in Anwesenheit von stimulierenden Halogenidionen hemmt, besitzt der Anionenkanal vielleicht eine Bindungs- aber keine Transporteigenschaft. Dieser Mechanismus ist somit für die Hemmwirkung von $N_3^{\ominus}$ auf die energieabhängige *in vitro*-Protonentranslokation am E.R. verantwortlich, wobei das Anion gegenüber $Cl^{\ominus}$ eine kompetitive Hemmung der Protonenpumpe bewirkt.

Obwohl die funktionellen und kinetischen Abläufe im Mechanismus des Anionentransports durch den Anionenkanal am E.R. noch ungeklärt sind, zeigen die vorhandenen Ergebnisse, daß die Ionenselektivität des Anionenkanals nicht nur von den lyotropen Eigenschaften, sondern auch von den Eigen-

schaften des Ionenradius und der räumlichen Struktur der Anionen bestimmt wird. Bei Auswertung der Literatur über Mechanismen des Anionentransports deuten die nachgewiesenen Eigenschaften der Ionenselektivität und der Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Hemmstoffen des Anionentransports daraufhin., daß der Anionenkanal im E.R. von DC-Zellen bestimmten Anionenkanälen in Membranen von tierischen Zellen zumindest in der Funktion und damit vielleicht sogar in der Struktur sehr ähnlich ist. Von den Anionenkanälen in den Membranen von tierischen Zellen ist das Anionentransportsystem im Plasmalemma der Erythrocyten am besten untersucht (CABANTCHIK et al., 1978). An die hochaffinen Bindungsstellen dieses Anionenkanals binden die Haloenidionen mit abnehmender Affinität in der Reihenfolge $\text{J}^{\ominus} > \text{Br}^{\ominus} > \text{Cl}^{\ominus} > \text{F}^{\ominus}$. Superoptimale Konzentrationen der Halogenidionen hemmen in der genannten Reihenfolge aber auch den Anionentransport, und dieses Phänomen ist offenbar die Folge einer Bindung der Anionen an eine zweite, niedrig affine Bindungsstelle, so daß es zu einer nichtkompetitiven Hemmung des Anionentransports kommt. Das Ausmaß der Anionenflux nimmt in der Reihe $\text{Cl}^{\ominus} > \text{F}^{\ominus} > \text{Br}^{\ominus} \gg \text{J}^{\ominus}$ ab, und der Transport der Halogenidionen wird durch aromatische Anionen wie SITS, DIDS, Probenecid oder Pyridoxalphosphat kompetitiv gehemmt. Dabei beruht die Hemmwirkung der für die Membran impermeablen aminoreaktiven Stilbendisulfonsäurederivate (SITS, DIDS) auf ihrer Bindung an ein intrinsisches Membranprotein, das sich aus zwei identischen Untereinheiten mit der Molekularmasse von 100 000 D zusammensetzt und entsprechend seinem elektrophoretischen Verhalten als Band-III-Protein in der Literatur bezeichnet wird. Ein intrinsisches Membranprotein mit einem vergleichbaren strukturellen Aufbau und der Funktion eines $\text{Cl}^{\ominus}$ -spezifischen Anionenkanals wurde auch in der Elektroploxmembran, d.h. im Plasmalemma von Zellen des elektrischen

Organs des Zitterrochens *Narke japonica* nachgewiesen und Anionin genannt (TAGUCHI & KASAI, 1980). In der Elektroplaxmembran einer anderen Zitterrochenart, *Torpedo californica*, wurde das Anionentransportsystem aufgrund seiner Ionenselektivität und seiner Hemmbarkeit durch Stilbendisulfonsäurederivate (SITS, DIDS) als ein Cl^- -spezifischer Anionenkanal charakterisiert. Dieser Anionenkanal tritt in zwei verschiedenen Funktionszuständen auf, nämlich in einem für den Anionenflux geöffneten oder geschlossenen Zustand. Das Gleichgewicht zwischen diesen Funktionszuständen, also auch das Ausmaß des Anionenflux, wird durch das Membranpotential bestimmt (WHITE & MILLER, 1979; MILLER & WHITE, 1980; WHITE & MILLER, 1981).

Das Vorkommen von spezifischen Anionenkanälen wird aufgrund der hohen Anionenselektivität und der zum Teil auch nachgewiesenen Empfindlichkeit gegenüber den zuvor genannten Hemmstoffen auch für den Anionentransport an den nachfolgend aufgeführten intrazellulären Membranen von Zellen mit sehr unterschiedlicher physiologischer Funktion im tierischen Organismus vermutet: Sarkoplasmatisches Retikulum (KASAI & KOMETANI, 1979), chromaffine Granula (PAZOLES & POLLARD, 1978), Serotonin-Sekretgranula (POLLARD et al., 1977), Parathyroidhormon-Sekretgranula (BROWN et al., 1978) und Insulin-Sekretgranula (HUTTON & PESHAVARIA, 1982). Cl^- -spezifische Anionenkanäle kommen offenbar auch am Plasmalemma und an intrazellulären Membranen von Pflanzenzellen vor. Außer dem in dieser Arbeit geführten Nachweis des Cl^- -spezifischen Anionentransportsystems am E.R. von DC-Zellen gibt es nämlich einige weitere Untersuchungen über den Cl^- -Transport in Pflanzenzellen, so z.B. am Plasmalemma (LIN, 1981), an mikrosomalen Membranen (HAGER & HELMLE, 1981) und am Tonoplasten (BENNETT & SPANSWICK, 1983) von *Zea mays* sowie am Plasmalemma von *Chara corallina* (KEIFER et al., 1982). In all diesen Untersuchungen wurde zwar die

Empfindlichkeit des Cl^- -Transports gegenüber aminoreaktiven Sulfonsäurestilbenderivaten nachgewiesen, doch fehlen bis jetzt Angaben zum strukturellen Aufbau der membrangebundenen Cl^- -spezifischen Anionentransportsysteme in Pflanzenzellen. Folglich ist für die Cl^- -spezifischen Anionentransportsysteme an Membranen von pflanzlichen und tierischen Zellen eine auffällige Gemeinsamkeit hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften nachgewiesen, aber eine Ähnlichkeit in ihrem strukturellen Aufbau kann augenblicklich nur vermutet werden.

Da der Aufbau eines mit der NR-Methode nachweisbaren pH-Gradienten (ΔpH) am E.R. von DC-Zellen nur bei einer energieabhängigen Protonentranslokation und bei gleichzeitigem Cotransport von Cl^- möglich ist, stellt sich die Frage, wie die H^+ -translozierende ATPase und der Cl^- -spezifische Anionenkanal am E.R. funktionell miteinander gekoppelt sind. Eine mögliche Erklärung für die funktionelle Kopplung ist, daß eine elektrogene H^+ -translozierende ATPase mit einem durch das Membranpotential ($\Delta\psi$) gesteuerten Anionenkanal zusammenwirkt. Eine solche Vorstellung entspricht weitgehend dem Modell, das den Mechanismus der Anionenstimulation der H^+ -translozierenden ATPase in der Membran der chromaffinen Granula beschreibt (POLLARD et al., 1979; PAZOLES et al., 1980; JOHNSON et al., 1982). Der gleiche oder zumindest ein ähnlicher Mechanismus des gekoppelten Protonen- und Anionentransports wird auch für die energieabhängige Ansäuerung des Lumens von folgenden intrazellulären Vesikeln in tierischen Zellen mit unterschiedlicher physiologischer Funktion angenommen: Serotonin-Sekretgranula (POLLARD et al., 1977; CARTY et al., 1981), Parathyroidhormon-Sekretgranula (BROWN et al., 1978), Sekretgranula in Zellen der Adenohypophyse (LORENSON et al., 1981; CARTY et al., 1982), Insulin-Sekretgranula (HUTTON, 1982; HUTTON & PESHAVARIA, 1982) und Lysosomen (SCHNEIDER, 1981; OHKUMA et al., 1982).

Die Anwendung des Modells der anionenstimulierbaren Protonenpumpe der chromaffinen Granula bedeutet für den Mechanismus der Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen, daß in Abwesenheit von stimulierenden Anionen die ATPase nur eine begrenzte Anzahl von H^+ über die E.R.-Membran transloziert und dabei gleichzeitig die trans-Seite der E.R.-Membran positiv auflädt, d.h. zu einer Hyperpolarisation der Membran führt. Diese Eigenschaft würde die ATPase als eine elektrogene Protonenpumpe kennzeichnen. Die Hyperpolarisation bewirkt eine Hemmung der Protonentranslokation der ATPase und verhindert somit den Aufbau eines in der Größenordnung bedeutenden, d.h. auch mit der NR-Methode meßbaren pH-Gradienten (ΔpH). Das Membranpotential ($\Delta \psi$) überführt dann den Anionenkanal von einem für den Anionenflux geschlossenen zu einem geöffneten Zustand, so wie dies für den Anionenkanal in der Elektropilaxmembran von *Torpedo californica* nachgewiesen wurde (WHITE & MILLER, 1979; MILLER & WHITE, 1980; WHITE & MILLER, 1981). In Anwesenheit von stimulierenden Anionen auf der cis-Seite der E.R.-Membran wird dann ein Anionenflux durch die Membran möglich, der schließlich zu einer Depolarisation der E.R.-Membran und in diesem Zustand zu einer erneuten Protonentranslokation durch die ATPase führt. Dies bewirkt einen ständigen elektroneutralen H^+ / Cl^- -Symport an der E.R.-Membran, so daß auch ein mit der NR-Methode meßbarer pH-Gradient (ΔpH) aufgebaut wird. Augenblicklich liegen zwar noch keine detaillierten Untersuchungen über diese Art der funktionellen Kopplung des H^+ -Flux mit dem Cl^- -Flux an der E.R.-Membran von DC-Zellen vor, doch das Fehlen eines pH-Gradienten (ΔpH) in Anwesenheit von Ionophoren, die die Membran für Metallkationen selektiv permeabel machen, ist ein erster Hinweis für die experimentelle Bestätigung des vorgeschlagenen Modells (Abb. 57).

Anionenstimulierbare, protonentranslozierende ATPasen, die Eigenschaften wie die in dieser Arbeit beschriebene Proto-

nenpumpe am E.R. von DC-Zellen aufweisen und somit vielleicht im Mechanismus dem vorgeschlagenen Modell entsprechen, wurden auch an intrazellulären Membranen aus Zellen weiterer Pflanzenarten gefunden. Eine dieser anionenstimulierbaren Protonenpumpen wurde, wie schon erwähnt, mit der NR-Methode an mikrosomalen Membranen aus Koleoptilzellen von *Zea mays* charakterisiert (HAGER & HELMLE, 1981). Ein Vergleich der mit der NR-Methode nachgewiesenen Eigenschaften der Protonenpumpen von *Zea mays* und *Daucus carota* läßt, obwohl unterschiedliche biologische Systeme, nämlich intakte Pflanzenorgane bzw. *in-vitro* kultivierte Pflanzenzellen als Untersuchungsmaterial verwendet wurden, keine qualitativen, sondern allenfalls geringe quantitative Unterschiede erkennen. In Hinsicht auf die intrazelluläre Lokalisation der Protonenpumpe bei *Zea mays* wird von HAGER & HELMLE (1981) angenommen, daß die mikrosomale Membranfraktion native Vesikel und Prävakuo len des Golgi-E.R.-Lysomen-Komplexes (GERL) enthält. Mit prinzipiell anderen biochemischen und physikochemischen Nachweismethoden konnten das Vorkommen und die Eigenschaften der anionenstimulierbaren Protonenpumpe bei *Zea mays* an mikrosomalen Membranen sowohl aus Koleoptilzellen (METTLER et al., 1982) als auch aus Wurzelzellen (DU PONT et al., 1982a) bestätigt werden. Für die Lokalisation der anionenstimulierbaren Protonenpumpe am Tonoplasten sprechen vor allem einige Untersuchungen über die energieabhängige Protonentranslokation an isolierten Vakuolen bzw. an Tonoplasten-Vesikeln nach Homogenisation der Vakuolen im hypotonischen Medium. Mit dieser Methodik konnte der Typ der anionenstimulierbaren protonentranslozierenden ATPase am Tonoplasten von *Hevea brasiliensis* (D'AUZAC, 1977; MARIN & BLASCO, 1982), *Beta vulgaris* (ADMON et al., 1981; WALKER & LEIGH, 1981) und *Saccharomyces cerevisiae* (KAKINUMA et al., 1981) einwandfrei nachgewiesen werden. Im Widerspruch zu diesen Befunden stehen zwei Ergebnisse über das Vorkommen einer vanadatempfindlichen Protonenpumpe am Tonoplasten von *Beta vulgaris* (DOLL & HAUER, 1981) und *Tulipa* (WAGNER & MULREADY,

1983). In beiden Untersuchungen fehlen jedoch detaillierte Angaben in Hinsicht auf die Ionenstimulierbarkeit, die Spezifität des Energiesubstrats und die Hemmstoffcharakteristik, so daß es augenblicklich noch nicht möglich ist, das vanadatempfindliche Enzym dem Typ der Kationen/Protonen-austauschenden ATPase zuzuordnen. Aufgrund dieser widersprüchlichen Befunde am Tonoplasten, dies betrifft vor allem die Situation bei *Beta vulgaris*, muß in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, ob bestimmte intrazelluläre Membranen in Pflanzenzellen die beiden in der Struktur so unterschiedlichen Typen der protonentranslozierenden ATPasen enthalten, nämlich die anionenstimulierbare vanadatunempfindliche $F_0 \cdot F_1$ -ATPase sowie die vielleicht kationenstimulierbare vanadatempfindliche ATPase mit dem intermediären Phosphorylierungsschritt im Enzymmechanismus.

Der Nachweis von protonentranslozierenden ATPasen gelang auch bei weiteren Pflanzenarten, aber die dazu vorliegenden Ergebnisse erlauben noch nicht eine eindeutige Identifizierung des Typs der Protonenpumpen. So wurde an isolierten mikrosomalen Membranen aus Zellen von *Pisum sativum* eine vanadatunempfindliche Protonenpumpe gefunden, von der die intrazelluläre Lokalisation sowie die Art der nachgewiesenen Ionenstimulierbarkeit augenblicklich noch nicht geklärt sind (VIANELLO et al., 1982). Aus Kalluszellen von *Nicotiana tabacum* wurde von SZE (1980, 1982) eine in der Schwebefraktion leichte Fraktion mikrosomaler Membranen isoliert, die sich offensichtlich aus inside-out-Vesikeln des Plasmalemma sowie aus right-side-out-Vesikeln des Tonoplasten zusammensetzt. Als Folge der heterogenen Zusammensetzung der mikrosomalen Membranen wurden sowohl in Hinsicht auf die Hemmbarkeit durch Vanadat als auch auf die Art der Ionenstimulierbarkeit beide Typen von Protonenpumpen nachgewiesen; allerdings erfolgte noch keine eindeutige Zuordnung der Hemmstoffempfindlichkeit zu der Art der Ionenstimulierbarkeit der Protonenpumpen. Trotzdem kann mit einiger Sicherheit

davon ausgegangen werden, daß die mikrosomalen Membranen aus Kalluszellen von *Nicotiana tabacum* genauso wie die aus DC-Zellen die anionenstimulierbare vanadatunempfindliche Protonenpumpe enthalten. Im Widerspruch zu den bekannten Eigenschaften der zuvor diskutierten Protonenpumpen berichteten STOUT & CLELAND (1982) über das Vorkommen einer anionenstimulierbaren aber vanadatempfindlichen protonentranslozierenden ATPase an mikrosomalen Membranen aus Wurzelzellen von *Avena sativa*. Da die mikrosomalen Membranen mit der Methode nach SZE (1980) isoliert wurden, ist anzunehmen, daß sich der Befund der anionenstimulierbaren vanadatempfindlichen Protonentranslokation mit der von SZE (1982) diskutierten heterogenen Zusammensetzung der mikrosomalen Membranfraktion erklären läßt. Außerdem fanden STOUT & CLELAND (1982), daß sich das Ausmaß der energieabhängigen Protonentranslokation (ΔpH) bei Zusatz von 50 mM Cl^- -Ion erhöht, aber unter diesen Bedingungen unabhängig von der An- oder Abwesenheit von 0.1 mM SCN^- -Ionen ist. Da von SCN^- -Ionen bekannt ist, daß sie leicht durch Membranen permeieren und die Ladung von translozierten Kationen, hier H^+ , neutralisieren, schlossen die Autoren, daß die Cl^- -Stimulation der Protonenpumpe bei *Avena sativa* nicht auf dem Mechanismus des H^+/Cl^- -Symports, sondern auf einer direkten Wirkung der Cl^- -Ionen auf die protonentranslozierende ATPase beruht. Diese Interpretation der Anionenstimulation ist bestimmt nicht zutreffend, da, wie HAGER & HELMLE (1981) unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen für die Protonenpumpe bei *Zea mays* zeigen konnten, bei Anwesenheit von 50 mM Cl^- -Ionen ein im Ausmaß so bedeutender pH-Gradient (ΔpH) aufgebaut wird, daß 0.1 mM SCN^- -Ionen bei weitem nicht ausreichen, die elektrische Ladung der translozierten H^+ zu neutralisieren und den Aufbau des pH-Gradienten (ΔpH) wirksam zu verhindern.

Als Folge dieser kritischen Einschätzung der Ergebnisse von STOUT & CLELAND (1982) und bei dem augenblicklichen

Erkenntnisstand ist es nahezu unwahrscheinlich, daß in Pflanzenzellen an intrazellulären Membranen der Typ einer durch Anionen direkt stimulierbaren vanadatempfindlichen Protonenpumpe vorkommt. Vielmehr deuten die in der Literatur vorhandenen Ergebnisse darauf hin, daß an intrazellulären Membranen in pflanzlichen wie auch in tierischen Zellen die vanadatunempfindliche protonentranslozierende ATPase, wahrscheinlich vom modifizierten Typ der F_0 - F_1 -ATPase vorkommt, deren Aktivität durch Anionen stimulierbar ist, wobei die Stimulation auf einem mit der Protonentranslokation gekoppelten Anionenflux durch spezifische Anionenkanäle in den Membranen beruht. Wie es mit Ergebnissen aus der Literatur an anderer Stelle schon dargestellt wurde, tritt die anionenstimulierbare Protonenpumpe in tierischen Zellen an den Membranen der Lysosomen sowie der exocytotischen Sekretgranula auf und kommt in pflanzlichen Zellen am Tonoplasten sowie an isolierten Membranvesikeln des E.R.-G.A.-Komplexes vor. Augenblicklich sind die dynamischen Abläufe, die zur Bildung der exocytotischen Membranvesikel sowie der Lysosomen bzw. der Vakuolen aus dem Endomembransystem, dem GERL-Komplex führen, in den Einzelheiten weder für die tierische noch für die pflanzliche Zelle restlos geklärt (NOVIKOFF, 1976; MARTY, 1978; MOLLENHAUER & MORRÉ, 1980; FARQUHAR & PALADE, 1981). Dennoch fällt als eine mögliche Gemeinsamkeit der pflanzlichen und tierischen Zelle auf, daß die anionenstimulierbaren Protonenpumpen in beiden Zelltypen an intrazellulären Membranen lokalisiert sind, die im Verlauf der Zelldifferenzierung eine vergleichbare Biogenese durchlaufen und dann Kompartimente mit bestimmten aber vergleichbaren Funktionen gegen das Cytoplasma abgrenzen.

Die primäre physiologische Funktion der Protonenpumpen ist sicherlich der energieabhängige, d.h. ATP-verbrauchende Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten an den zuvor genannten intrazellulären Membranen der pflanzlichen

und tierischen Zellen. Nach der chemiosmotischen Hypothese von MITCHELL (1961, 1966) setzt sich der elektrochemische Protonengradient ($\Delta \bar{\mu}_{H^+}$) aus einer elektrischen Komponente, dem Membranpotential $\Delta \psi$, und aus einer chemischen Komponente, dem pH-Gradienten (ΔpH), wie folgt zusammen:

$$\Delta \bar{\mu}_{H^+} = \Delta \psi - 59 \Delta pH \quad .$$

Dieser elektrochemische Protonengradient wird von den Zellen genutzt, um über ein komplexes System verschiedener membran- gebundener und substratspezifischer Transportmechanismen Kationen, Anionen (s. Cl^- -Kanal) sowie Nichtelektrolyte vom einem Kompartiment in das andere zu transportieren (POOLE, 1978). Aus der umfangreichen Literatur über die von dem elektrochemischen Protonengradienten ($\Delta \bar{\mu}_{H^+}$) angetriebenen Transportvorgänge an intrazellulären Membranen werden hier nur drei repräsentative Beispiele angeführt. In isolierte, vielleicht native Membranvesikel des GERL aus Koeleptilzellen von *Zea mays* (HAGER & HELMLE, 1981; HAGER & HERMSDORF, 1981) und auch, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in solche des E.R. aus DC-Zellen werden Cl^- - bzw. Ca^{2+} - Ionen über einen H^+/Cl^- -Symport bzw. H^+/Ca^{2+} - Antiport aufgenommen. Das zweite Beispiel betrifft die Transportvorgänge am Tonoplasten, die zur Aufnahme und Speicherung von Mineralsalzen und organischen Substanzen in der Vakuole führen (MARTY et al., 1980). Schließlich sei die Aufnahme und Speicherung von Ca^{2+} , ATP, Catecholaminen und weiteren Substanzen in den chromaffinen Granula als ein Beispiel für exocytotische Sekretgranula in tierischen Zellen genannt (NJUS & RADDI, 1978; POLLARD et al., 1979).

Sekundäre, aber physiologisch gleichermaßen bedeutende Funktionen der membrangebundenen anionenstimulierbaren Protonenpumpen sind die Erniedrigung des Wasserpotentials im Lumen der intrazellulären Kompartimente und der Aufbau

eines in der Größenordnung beträchtlichen pH-Gradienten (ΔpH) an den intrazellulären Membranen als Folge der über das Membranpotential ($\Delta \psi$) vermuteten Kopplung des Protonen- und Anionenfluxes (z.B. H^+ / Cl^- -Symport). Die Erniedrigung des Wasserpotentials im Lumen der intrazellulären Kompartimente wird hervorgerufen durch die von dem elektrochemischen Protonengradienten ($\Delta \bar{\mu}_{H^+}$) angetriebenen Transportvorgänge, die zu einem Influx von niedermolekularen, d.h. osmotisch wirksamen Substanzen führen. Die Differenz im Wasserpotential bewirkt einen Influx von Wasser, der *in vivo* entsprechend der chemiosmotischen Hypothese der Exocytose (CASEY et al., 1976; PAZOLES & POLLARD, 1978) wahrscheinlich die Voraussetzung für die Fusion von sekretorischen Vesikeln mit anderen Membranen ist (COHEN et al., 1982). Allerdings ist die Relevanz der chemiosmotischen Hypothese der Exocytose für den Prozeß in den pflanzlichen Zellen experimentell noch nicht abgesichert, zumal isolierte exocytotische Membranvesikel mit Sekretprodukten als Inhalt bisher noch nicht auf das Vorkommen einer anionenstimulierbaren Protonenpumpe untersucht worden sind (CONRAD et al., 1982; WIENECKE et al., 1982). Die Aktivität der anionenstimulierbaren Protonenpumpe am Tonoplasten reguliert wahrscheinlich das Wasserpotential der Vakuole und damit den Turgor der Pflanzenzelle. Der durch die anionenstimulierbare Protonentranslokation aufgebaute niedrige pH-Wert im Lumen von intrazellulären Kompartimenten ist in den Lysosomen der tierischen Zellen sowie in den lytischen Provakuolen der pflanzlichen Zellen die Voraussetzung für die Aktivität von lytischen Enzymen, die die in den Prozessen der Endocytose bzw. Autophagie aufgenommene chemische Substanz der Makromoleküle bzw. Organellen abbauen (SILVERSTEIN et al., 1977; GOLDSTEIN & BROWN, 1977; MARTY et al., 1980). Schließlich wird für das auxininduzierte Streckungswachstum nach der Hypothese des "bucket-brigade-mechanism" von RAY (1977) vermutet, daß exocytotische Membranvesikel des E.R. mit Protonen stark angereichert sind und nach Fusion mit dem Plasmalemma die Protonen in die lokale Zellwandmatrix abgeben.

Aus dieser Übersicht der primären und sekundären Funktionen der anionenstimulierbaren Protonenpumpe an intrazellulären Membranen wird die physiologische Bedeutung des Enzyms bei der Beeinflussung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen der pflanzlichen Zelle deutlich, so daß sich die Frage nach der Regulation des Enzyms stellt. Bevor der in dieser Arbeit experimentell nachgewiesene Regulationsmechanismus der anionenstimulierbaren Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen im einzelnen diskutiert und damit auf die vermutete Primärreaktion des Auxins eingegangen wird, soll nach der physiologischen Relevanz von einigen anderen Faktoren für die Regulation der Protonentranslokation gefragt werden. Diese Faktoren, die den energieabhängigen Aufbau eines pH-Gradienten (ΔpH) an der E.R.-Membran vollständig verhindern können, sind Ca^{2+} , NH_4^+ und NO_3^- sowie die Erniedrigung des ATP/ADP-Verhältnisses.

Die Wirkung von Ca^{2+} auf das Ausmaß der Protonentranslokation läßt sich zwar damit erklären, daß die anionenstimulierbare Protonenpumpe an der E.R.-Membran von DC-Zellen wie die meisten membrangebundenen protonentranslozierenden ATPasen des F_0F_1 -Typs als Energiesubstrat nicht Ca^{2+} verwenden kann (MUNOZ, 1982). Unter der Annahme einer geringen passiven Protonenpermeabilität der E.R.-Membran erklärt dieser Mechanismus jedoch nicht das Phänomen, daß ein schon vorhandener pH-Gradient (ΔpH) bei Zusatz von Ca^{2+} mit einer Geschwindigkeit abgebaut wird, die der Wirkung protonophorer Substanzen entspricht. Aus diesem Grund ist es vielmehr wahrscheinlich, daß die Ca^{2+} -Wirkung auf die Protonentranslokation vor allem auf der Aktivität eines Ca^{2+}/H^+ -Antiports in der E.R.-Membran beruht. Dieser membrangebundene Transportmechanismus ist spezifisch für Ca^{2+} , da die Wirkung von zweiwertigen Metallkationen in der Reihe $Ca^{2+} \gg Mn^{2+} > Co^{2+} = Mg^{2+}$ abnimmt. Ein solcher Austausch von Ca^{2+} gegen H^+ wurde auch an isolierten mikrosomalen Membranen aus pflanzlichen Zellen von *Zea mays*

(HAGER & HERMSDORF, 1982), *Pisum sativum* (RASI-CALDOGNO et al., 1982) und *Malus pumila* (FUKUMOTO & NAGAI, 1982) nachgewiesen. Dieser Transportmechanismus scheint im Organismenreich systematisch weit verbreitet zu sein, denn er tritt z.B. auch am Plasmalemma des Pilzes *Neurospora crassa* (STROOBANT & SCARBOROUGH, 1979), am Tonoplasten von *Saccharomyces cerevisiae* (OHSUMI & ANRAKU, 1982) sowie in tierischen Zellen in der Mitochondrienmembran (FISKUM & LEHNINGER, 1979) und am sarkoplasmatischen Retikulum (UENO & SEKINE, 1981 a,b) auf. Da Ca^{2+} im Cytosol von pflanzlichen und tierischen Zellen höchstens im mikromolaren Konzentration vorkommt (WILLIAMSON, 1981), *in vitro* der energieabhängige Aufbau eines pH-Gradienten (ΔpH) an der E.R.-Membran von DC-Zellen aber erst durch Ca^{2+} in millimolarer Konzentration verhindert wird, ist anzunehmen, daß *in vivo* der $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiport nicht für eine Regulation des pH-Gradienten (ΔpH) genutzt wird, sondern im Gegenteil einen Mechanismus für die Regulation der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol darstellt.

Die Hemmwirkung von NH_4^+ ist *in vitro* die Folge einer Neutralisation des von der anionenstimulierbaren Protonenpumpe an der E.R.-Membran aufgebauten pH-Gradienten (ΔpH) durch NH_3 , das bekanntlich in wässriger Lösung mit NH_4^+ in einem Protolysegleichgewicht steht und leicht durch biologische Membranen permeiert (KLEINER, 1981). Dagegen beruht die Wirkung von NO_3^- wahrscheinlich auf einer spezifischen Hemmung der Enzymaktivität der protonentranslozierenden ATPase und nicht auf einer Kompetition des Anions mit Cl^- -Ionen um den Transport in dem mit der ATPase funktionell gekoppelten Cl^- -spezifischen Anionenkanal. Eine solche NO_3^- -Hemmung der ATPase konnte nämlich an membrangebundenen anionenstimulierbaren Protonenpumpen bei *Beta vulgaris* (WALKER & LEIGH, 1981), *Nicotiana tabacum* (SZE, 1982) und *Zea mays* (DU PONT et al., 1982 b) nachgewiesen werden. Wie

die Ionenkonzentration, die den Aufbau eines halbmaximalen pH-Gradienten erlauben ($K_i [\text{NH}_4^+] \cong K_i [\text{NO}_3^-] \cong 4 \text{ mmol l}^{-1}$ bei $[\text{Cl}^-] = 100 \text{ mmol l}^{-1}$), zeigen, verhindern NH_4^+ - und NO_3^- -Ionen trotz ihrer verschiedenen Wirkungsmechanismen den Aufbau eines Protonengradienten (ΔpH) an der E.R.-Membran von DC-Zellen *in vitro* mit dem gleichen Wirkungsgrad. *In vitro* tritt die Hemmwirkung von NH_4^+ - oder NO_3^- -Ionen also bei millimolaren Konzentrationen auf, *in vivo* ist sie nur dann vorstellbar, wenn es zu einer Anreicherung dieser Ionen im Cytosol kommt. Dagegen ist die *in vitro* nachgewiesene Regulation der anionenstimulierbaren Protonentranslokation an der E.R.-Membran von DC-Zellen durch das ATP/ADP-Verhältnis wahrscheinlich *in vivo* von physiologischer Bedeutung, auch wenn der molekulare Mechanismus augenblicklich noch nicht endgültig geklärt ist. Eine Erniedrigung des ATP/ADP-Verhältnisses könnte an der ATPase der Protonenpumpe zu einer veränderten Besetzung von regulatorischen Nukleotidbindungsstellen führen, deren Vorkommen für ATPasen des $\text{F}_0\text{-F}_1$ -Typs nachgewiesen ist (SENIOR, 1979; MUÑOZ, 1982). Da Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen an der E.R.-Membran ablaufen, ist es aber auch in Anwendung der Vorstellungen von GRESSER (1983) möglich, daß die Erniedrigung des ATP/ADP-Verhältnisses den Phosphorylierungsstand membrangebundener Enzyme verändert und damit auch die Aktivität der Protonenpumpe herabsetzt.

4.3. Regulation der Protonenpumpe am E.R. durch reversible Proteinphosphorylierung

Nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit enthalten isolierte Membranen des E.R. aus DC-Zellen sowohl hochaffine Auxinbindungsstellen als auch anionenstimulierbare protonentranslozierende ATPasen, die funktionell so zusammenwirken, daß *in vitro* eine auxinstimulierbare Protonentranslokation an der Membran erfolgt. Diese auxinstimulierbare Protonentranslokation entspricht dem molekularen Mechanismus, den HAGER et al. (1971) in ihrer Hypothese zur Erklärung des auxininduzierten Streckungswachstums von Zellen höherer Pflanzen vermuteten. Diese Hypothese zur Primärreaktion des Auxins war bisher experimentell nicht bestätigt worden. Selbst HAGER & HELMLE (1981) konnten eine *in vitro*-Stimulation der anionenstimulierbaren protonentranslozierenden ATPase an intrazellulären Membranen aus Koleoptilzellen von *Zea mays* durch Auxin noch nicht nachweisen. Die wenigen zu dieser Thematik in der Literatur vorliegenden Berichte betreffen den Nachweis einer *in vitro*-Stimulation von membrangebundenen ATPasen durch Auxin, ohne allerdings für die Enzyme die Funktion der Protonentranslokation an der Membran gezeigt zu haben. In diesen Untersuchungen wurden zudem für die Enzyme weder die Substratspezifität für ATP noch die Empfindlichkeit gegenüber spezifischen ATPase-Hemmstoffen nachgewiesen, so daß die Enzyme eigentlich nicht zweifelsfrei als ATPasen identifiziert wurden.

Der erste Befund über die Stimulation einer membrangebundenen ATPase durch Auxin findet sich bei KASAMO & YAMAKI (1974), die das Enzym an isolierten Membranen aus Hypokotylzellen von *Phaseolus mungo* untersuchten. Dabei stellten die Autoren fest, daß auch bei einer *in vivo*-Vorinkubation der Hypokotyle mit Auxin die Aktivität der isolierten membrangebundenen ATPase *in vitro* nur bei Zusatz von Auxin erhöht

wird. In einer späteren Untersuchung konnten CLELAND & RAYLE (1978) diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen. Dagegen wurde eine *in vitro*-Stimulation von ATPasen durch Auxin an isolierten Membranen aus Hypokotylzellen von *Glycine max* (SCHERER & MORRÉ, 1978) und von *Cucurbita maxima* (SCHERER, 1981) gefunden. In beiden Untersuchungen wurden die Membranen mit einer Methode isoliert, die die Aktivität von endogenen Phospholipasen hemmte und damit eine unkontrollierte Veränderung der Phospholipidzusammensetzung der Membran verhinderte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von KASAMO & YAMAKI (1974) fanden ERDEI et al. (1979) nach einer *in vivo*-Vorinkubation von *Oryza sativa*-Wurzeln mit Auxin im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen eine erhöhte Aktivität einer durch Ca^{2+} und K^{+} stimulierbaren ATPase, die für die K^{+} -Aufnahme der Zellen verantwortlich sein soll. Die membrangebundene ATPase ließ sich auch *in vitro* durch Auxin stimulieren. Nach Isolierung der ATPase aus der Membran erhöhte Auxin die Aktivität des Enzyms im Rekonstitutionsexperiment mit Phospholipiden nur bei Anwesenheit von Ca^{2+} . Nach Ansicht der Autoren weisen diese Ergebnisse der *in vivo*- als auch *in vitro*-Stimulation der ATPase durch Auxin auf eine direkte Wechselwirkung des Phytohormons mit dem Enzymprotein hin, für die die Anwesenheit von Ca^{2+} eine funktionelle Voraussetzung ist. Im Widerspruch zu dieser Vermutung konnten CROSS et al. (1978) mit der Methode der Gelpermeationschromatographie nachweisen, daß nach einer Detergenzbehandlung der mikrosomalen Membranen aus Koeoptilzellen von *Zea mays* die freigesetzten Proteine mit den Funktionen der hochaffinen Auxinbindung und der Mg^{2+} abhängigen, K^{+} -stimulierbaren ATPase nicht identisch sind.

Auch die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, daß Auxin die Aktivität der protonentranslozierenden ATPase an der E.R.-Membran von DC-Zellen nicht direkt stimuliert. Vielmehr lassen die Ergebnisse vermuten, daß diese Protonenpumpe durch eine Phosphorylierung des Proteins aktiviert

sowie durch eine Dephosphorylierung des Phosphoproteins abgeschaltet wird und die dafür verantwortlichen Enzyme, nämlich die Proteinkinase (EC 2.7.2.37) indirekt durch Auxin sowie die Phosphoproteinphosphatase (EC 3.1.3.16) direkt durch Calmodulin (CaM) kontrolliert werden (Abb. 58). Es ist aber noch vollkommen ungeklärt, ob das Protein der protonentranslozierenden ATPase oder das des Cl^- -spezifischen Anionenkanals reversibel phosphoryliert wird. In diesem Zusammenhang sind folgende Ergebnisse interessant. Eine Proteinphosphorylierung des Cl^- -spezifischen Anionenkanals im Plasmalemma von Erythrozyten wurde experimentell nachgewiesen (DEKOWSKI et al., 1983). Experimentelle Hinweise für eine reversible Proteinphosphorylierung einer protonentranslozierenden ATPase in Pflanzenzellen und darüber hinaus, wenn die Vermutung hinsichtlich des Struktur- und Funktionstyps zutreffend ist, einer ATPase des modifizierten F_0F_1 -Typs fehlen aber in der Literatur. Bisher wurde nämlich die Proteinphosphorylierung nur an folgenden ATPasen, die dem Struktur- und Funktionstyp des vanadatempfindlichen Kationentranslozierenden Enzyms angehören, nachgewiesen: Na^+/K^+ -ATPase (SPECTOR et al., 1980; YEH et al., 1983) und Ca^{2+} -ATPase (SPITZER et al., 1983) am Plasmalemma von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, Ca^{2+} -ATPase am sarkoplasmatischen Retikulum (CARONI & CARAFOLI, 1981) sowie H^+ -ATPase am Plasmalemma von *Saccharomyces cerevisiae* (MCDONOUGH & MAHLER, 1982).

Da die Proteine der Protonenpumpe noch nicht aus der Membran des E.R. von DC-Zellen isoliert worden sind, somit ihre molekularen Eigenschaften noch unbekannt sind und zu ihrer Identifizierung in analytischen Trennverfahren nicht genutzt werden konnten, war es augenblicklich experimentell noch nicht möglich, nach Inkubation der E.R.-Membran mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ die spezifische Phosphorylierung eines Proteins der Protonenpumpe bzw. nach erfolgter ^{32}P -Markierung des Proteins seine Dephosphorylierung direkt zu zeigen. Folglich

sind die experimentellen Hinweise für die reversible Proteinphosphorylierung der Protonenpumpe nur indirekt, denn sie beruhen auf der Anwendung von Hemmstoffen für Phosphoproteinphosphatasen bzw. Proteinkinasen und ihrer Wirkung auf die Protonentranslokation an der E.R.-Membran. Im übrigen wurde auch mit dieser Methodik die reversible Proteinphosphorylierung der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1) aus *Spinacia oleracea* (RAO & RANDALL, 1980) und der Chinon: NAD⁺-oxidoreduktase (EC 1.1.1.24) aus DC-Zellen (REFENO et al., 1982) nachgewiesen.

Im einzelnen sind folgende Ergebnisse die experimentelle Evidenz für das Vorkommen der CaM-kontrollierten Phosphoproteinphosphatase und ihrer regulatorischen Funktion bei der Protonentranslokation an der E.R.-Membran von DC-Zellen: Die Aktivität der Protonenpumpe ließ sich *in vitro* durch physiologische Konzentrationen ($1 \mu\text{g/ml} \approx 60 \text{ nmol l}^{-1}$) von CaM stark hemmen, und diese Hemmung der Protonentranslokation konnte durch den Ca^{2+} -Chelator EGTA sowie durch Vanadat, Molybdat und Fluorid, Hemmstoffen von Phosphoproteinphosphatasen aufgehoben werden. In diesen Versuchen wurde Calmodulin (CaM) aus Schweinehirn eingesetzt. Die Verwendung von tierischen CaM schränkt aber weder die Aussagekraft noch die physiologische Relevanz der Ergebnisse ein. CaM ist ein Protein mit einer Molekularmasse von 16 700 D und besitzt vier hochaffine Ca^{2+} -Bindungsstellen, die in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sequentiell besetzt werden. Im Ca^{2+} -beladenen Zustand bindet CaM an bestimmte cytosolische und membrangebundene Enzyme, die dadurch in ihrer Aktivität erheblich stimuliert, d.h. reguliert werden (MEANS & DEDMAN, 1980). CaM konnte in vielen tierischen aber auch in einigen pflanzlichen Organismen nachgewiesen werden, und es stellt sich immer mehr heraus, daß das Protein ein wesentlicher und charakteristischer Regulationsfaktor in allen eukaryontischen Zellen ist (KLEE et al., 1980). Aus diesem Grund ist mit Sicherheit anzunehmen, daß

DC-Zellen *in vivo* endogenes CaM enthalten, zumal es experimentelle Hinweise für das Vorkommen des Proteins in Extrakten aus *Daucus carota*-Pflanzen gibt (ANDERSON & CORMIER, 1978). Außerdem sind sich pflanzliches und tierisches CaM in ihren molekularen, physikochemischen und immunologischen Eigenschaften so ähnlich, daß das eine das andere bei CaM-abhängigen biochemischen Reaktionen *in vitro* problemlos ersetzen kann (ANDERSON et al., 1980; WATTERSON et al., 1980). Nach der Untersuchung von MUTO (1982) über die intrazelluläre Lokalisation von CaM enthalten das Cytosol 89-93 %, Mitochondrien 5-9 %, Chloroplasten 1-2 % und mikrosomale Membranen < 1 % des Proteins in Blattzellen von *Triticum aestivum*. Das Ergebnis verdeutlicht, daß nach einer Präparation von mikrosomalen Membranen die CaM-Abhängigkeit von membrangebundenen Enzymen oft nur bei Zugabe von exogenem CaM nachzuweisen ist. Diese Feststellung gilt grundsätzlich auch für die isolierten Membranen des E.R. aus DC-Zellen. Wie die Verstärkung der Protonentranslokation bei Zusatz von EGTA oder Phosphatasehemmstoffen zeigt, enthalten isolierte E.R.-Membranen offensichtlich endogenes CaM, das die Aktivität der Protonenpumpe herabsetzt.

Endogenes wie exogenes CaM regulieren die Aktivität der Protonenpumpe nicht direkt und binden somit auch nicht an das Enzym. Diese Aussage läßt sich wie folgt begründen. Zunächst fällt bei einer Durchsicht der Literatur auf, daß die Aktivität von CaM-kontrollierten Enzymen durch CaM stimuliert aber nicht gehemmt wird (KLEE et al., 1980; MEANS & DEDMAN, 1980). Auch wirken Phenothiazinderivate wie Trifluoperazin (TFP) und Chlorpromazin (CPZ), die hochaffine Liganden für CaM sind und dadurch seine regulatorische Funktion verhindern (LEVIN & WEISS, 1977, 1979), nicht als CaM-Antagonisten, denn die Protonentranslokation wird durch sie nicht erhöht, wie dies bei einer direkten CaM-Wirkung zu erwarten wäre, sondern gehemmt. Weiterhin wird die Hemmung der Protonentranslokation durch CaM bei Anwesenheit von Vanadat, Molybdat

und Fluorid aufgehoben. Diese Anionen hemmen die Protonentranslokation nicht, d.h. sie wirken nicht als Hemmstoffe der protonentranslozierenden ATPase an der E.R.-Membran. Vielmehr läßt die stimulierende Wirkung der Anionen auf die Protonentranslokation vermuten, daß sie hier als Hemmstoffe einer Phosphoproteinphosphatase wirken. Wie schon an anderer Stelle ausführlich dargestellt wurde, hemmt Vanadat die Aktivität von unterschiedlichen Phosphohydrolasen, die in ihrem Reaktionsmechanismus eine intermediäre kovalente Bindung zum Phosphat ausbilden (MACARA, 1980). Zu den vanadatempfindlichen Enzymen zählen auch die alkalischen Phosphatasen, EC 3.1.3.1 (LOPEZ et al., 1976), und für einige dieser Enzyme aus verschiedenen pro- und eukaryontischen Organismen konnte die Dephosphorylierung von Phosphoproteinen gezeigt werden (SWARUP et al., 1981). Inzwischen ließ sich für eine Phosphotyrosylproteinphosphatase die Hemmung der Enzymaktivität durch Vanadat experimentell zeigen (SWARUP et al., 1982). Auch die Hemmwirkung von Molybdat und Fluorid auf die Aktivität von Phosphoproteinphosphatasen wurde direkt in Experimenten nachgewiesen (PAIGEN, 1958; KHATRA & SODERLING, 1978; SHACTER-NOIMAN & CHOCK, 1983). Schließlich ist eine nukleotidspezifische Hemmung von Phosphoproteinphosphatasen durch ATP bekannt (KHATRA & SODERLING, 1978; LIN et al., 1980; SHACTER-NOIMAN & CHOCK, 1983), die wahrscheinlich das Phänomen erklärt, daß bei Zugabe von exogenem CaM in physiologischen Konzentrationen, d.h. auch bei maximaler Hemmwirkung von CaM, die Aktivität der ATP-abhängigen Protonenpumpe an der E.R.-Membran nicht völlig abgeschaltet wird. Zusammenfassend weisen alle diese Ergebnisse auf das Vorkommen einer CaM-stimulierbaren Phosphoproteinphosphatase am E.R. von DC-Zellen hin. Phosphoproteinphosphatasen mit einer Regulation durch CaM wurden in tierischen Zellen schon mehrfach nachgewiesen und sind schon lange als Calcineurin bekannt (STEWART et al., 1982; YANG et al., 1982). Aus Pflanzen wurde bisher nur eine Phospho-

proteinphosphatase isoliert, doch ihre mögliche Regulation wurde noch nicht untersucht (LIN et al., 1980).

Der experimentelle Hinweis für die antagonistische Reaktion zur Aktivität der CaM-stimulierbaren Phosphoproteinphosphatase und damit für das Vorkommen der Proteinkinase am E.R. von DC-Zellen ist die Hemmung der energieabhängigen Protonentranslokation durch spezifische Proteinkinaseinhibitoren (PKI). Diese Hemmstoffe kommen als niedermolekulare Proteine in tierischen Zellen vor (KREBS & BEAVO, 1979) und hemmen die Proteinphosphorylierung, indem sie mit dem Substrat um die Bindung an die katalytische Untereinheit der cAMP-stimulierbaren Proteinkinase kompetieren (DEMAILLE et al., 1977). Die Wirkung der tierischen Proteinkinaseinhibitoren auf die Proteinphosphorylierung in einem *in vitro*-System mit ausschließlich pflanzlichen Proteinen könnte bedeuten, daß sich die katalytischen Untereinheiten von bestimmten Proteinkinasen aus tierischen und pflanzlichen Zellen in Hinsicht auf ihre Konformation und ihren Reaktionsmechanismus sehr ähnlich sind.

Diese Vermutung besagt aber nicht unbedingt, daß die Aktivität der am E.R. von DC-Zellen lokalisierten Proteinkinase durch cAMP reguliert wird, denn bis jetzt gibt es keinen eindeutigen experimentellen Nachweis einer cAMP-stimulierbaren Proteinkinase in pflanzlichen Zellen, obwohl das Vorkommen von cAMP in höheren Pflanzen inzwischen als gesichert gelten kann (BROWN & NEWTON, 1981). Auch ist bei dem augenblicklichen Erkenntnisstand anzunehmen, daß in pflanzlichen Zellen Proteinkinasen nicht durch cGMP reguliert werden, wie dies von einigen Enzymen aus tierischen Zellen bekannt ist (KREBS & BEAVO, 1979). Weitere Faktoren, die in tierischen Zellen die Aktivität von bestimmten Proteinkinasen direkt kontrollieren, sind $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (SCHULMAN & GREENGARD, 1978) sowie Ca^{2+} und Phospholipide (TAKAI et al., 1979a).

Die Ca^{2+} /CaM stimulierbare Proteinkinase kommt wahrscheinlich auch in höheren Pflanzen vor, denn das Enzym konnte an mikrosomalen Membranen aus *Pisum sativum* nachgewiesen (HETHERINGTON & TREWAVAS, 1982) sowie aus Keimlingen von *Triticum aestivum* isoliert werden (POLYA & DAVIES, 1982). Es ist aber nahezu ausgeschlossen, daß am E.R. von DC-Zellen eine Ca^{2+} /CaM-stimulierbare Proteinkinase die Aktivität der Protonenpumpe durch Proteinphosphorylierung erhöht, da alle Ergebnisse, die zuvor schon ausführlich diskutiert wurden, auf das Vorkommen einer CaM-stimulierbaren Phosphoproteinphosphatase hinweisen, die durch Dephosphorylierung der Protonenpumpe die energieabhängige Protonentranslokation hemmt. Unter der Annahme, daß in pflanzlichen Zellen nicht eine Proteinkinase mit einer im Vergleich zu tierischen Zellen grundsätzlich anderen Regulation, d.h. hier einer direkten Regulation durch Auxin vorkommt, bleibt nur die Möglichkeit, daß die auxinkontrollierte Proteinphosphorylierung am E.R. von DC-Zellen durch den Typ der von Ca^{2+} und Phospholipiden abhängigen Proteinkinase erfolgt.

Die von Ca^{2+} und Phospholipiden abhängige Proteinphosphorylierung wurde zuerst von TAKAI et al. (1979a) im Cytosol von Hirnzellen der Ratte nachgewiesen und das dafür verantwortliche Enzym von den Autoren Proteinkinase C genannt. Wenig später konnte die Aktivität der Proteinkinase C in acht weiteren Tierarten aus vier Tierstämmen gezeigt und dabei für das Vorkommen des Enzyms weder eine Art- noch Gewebespezifität festgestellt werden (KUO et al., 1980). Unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei einer Ca^{2+} -Konzentration des Cytosols von $< 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, benötigt das Enzym zu seiner Aktivierung neben den Phospholipiden unbedingt geringe Konzentrationen von ungesättigtem Diacylglycerol (TAKAI et al., 1979b; KISHIMOTO et al., 1980). In Anwesenheit von Diacylglycerol wird die Affinität der Proteinkinase C für Ca^{2+} und für Phospholipide beträchtlich

erhöht (WISE et al., 1982b), so daß das Enzym reversibel an Phospholipidmembranen binden und dort seine volle Aktivität entfalten kann (TAKAI et al., 1979a). Dieser Mechanismus erklärt auch die subzelluläre Verteilung der Proteinkinase C in der tierischen Zelle: Das Enzym kommt vor allem frei im Cytosol ($\sim 70\%$) aber auch gebunden an intrazellulären Membranen ($\sim 20\%$) und am Plasmalemma ($\sim 10\%$) vor (KATOH & KUO, 1982). Entsprechend seiner subzellulären Lokalisation zeigt das Enzym eine breite Substratspezifität und phosphoryliert auch endogene, membrangebundene Proteine (WRENN et al., 1980; WISE et al., 1982a). Nach den Untersuchungen von WISE et al. (1982b) sowie KIKKAWA et al. (1982) besteht das Enzym aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer ungefähren Molekularmasse von 80 000 D. Das Protein besitzt einen hydrophilen Bereich mit der aktiven katalytischen Stelle sowie einen hydrophoben Bereich mit der Funktion der Membranbindung. Die Art der Wechselwirkung zwischen der Proteinkinase C und den Phospholipiden ist augenblicklich noch nicht geklärt, doch ist sie eine funktionelle Voraussetzung für die Aktivität des Enzyms, da Substanzen, die mit Phospholipiden in Wechselwirkung treten, die Proteinphosphorylierung vollständig hemmen. Zu diesen Hemmstoffen der Proteinkinase C zählen u.a. die Phenothiazinderivate wie Trifluoperazin ($K_i \leq 50 \mu\text{mol l}^{-1}$) und Chlorpromazin ($K_i \leq 84 \mu\text{mol l}^{-1}$) sowie das Peptidantibiotikum Polymyxin B ($K_i \approx 2 \mu\text{mol l}^{-1}$), und die Hemmwirkung dieser Substanzen beruht auf ihrer Kompetition mit membrangebundenen Phospholipiden in der näheren Umgebung des Enzyms (SCHATZMAN et al., 1981; MAZZEI et al., 1982).

Während die Proteinkinase C der tierischen Zelle in zahlreichen Untersuchungen, wie die Zusammenstellung der wesentlichen Ergebnisse zeigt, sehr gut charakterisiert ist, fehlt bisher der direkte experimentelle Nachweis des Enzyms für die pflanzliche Zelle. Doch die Ergebnis-

se in dieser Arbeit lassen sich unter Berücksichtigung ihrer möglichen kausalen Zusammenhänge als erste experimentelle Hinweise für das Vorkommen einer Proteinkinase C in Pflanzenzellen interpretieren: Die energieabhängige Protonentranslokation an der E.R.-Membran von DC-Zellen läßt sich nicht nur, wie schon erwähnt, durch Proteinkinaseinhibitoren, sondern auch durch die Phenothiazinderivate Trifluoperazin ($K_i = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) und Chlorpromazin ($K_i = 30 \mu\text{mol l}^{-1}$) sowie durch Polymyxin B ($K_i \approx 5 \mu\text{mol l}^{-1}$) hemmen. Außerdem enthält die Membran des E.R. lipolytische Enzyme (Phosphatidylsäurephosphatase, EC 3.1.3.4 und Phospholipase C, EC 3.1.4.10), die in der Membran durch den Abbau von endogenen Phospholipiden Diacylglycerol, den stimulierenden Faktor der Proteinkinase C freisetzen. Bei dieser Interpretation ist zu beachten, daß die Wirkung der Hemmstoffe nicht direkt an der isolierten Proteinkinase, sondern indirekt über die membrangebundene Protonenpumpe, deren Aktivität offensichtlich durch reversible Proteinphosphorylierung kontrolliert wird, festgestellt wurde. Deshalb muß bei der bekannten multiplen Wirkung der Hemmstoffe berücksichtigt werden, daß diese Substanzen auch auf andere membrangebundene Funktionen als die der Proteinkinase einwirken können. Es ist nämlich bekannt, daß die membrangebundene mitochondriale $F_0 \cdot F_1$ -ATPase, für die bisher eine Regulation ihrer Enzymaktivität durch Proteinphosphorylierung nicht nachgewiesen wurde, durch die Phenothiazinderivate Trifluoperazin mit einer Hemmkonstante $K_i = 7 \mu\text{mol l}^{-1}$ (RUBEN & RASMUSSEN, 1981) und Chlorpromazin mit einer Hemmkonstante $K_i = 26 \mu\text{mol l}^{-1}$ (CHAZOTTE et al., 1982) gehemmt wird. Diese Befunde sind wegen der an anderer Stelle schon diskutierten Ähnlichkeit in den strukturellen und funktionellen Eigenschaften der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase und der anionenstimulierbaren protonentranslozierenden ATPase zu beachten. Die Form der Hemmkurven scheint allerdings nicht unbedingt für eine Phenothiazin-

Empfindlichkeit der protonentranslozierenden ATPase am E.R. von DC-Zellen zu sprechen, da bei der Protonenpumpe eine sigmoidale, bei der mitochondrialen $F_0 \cdot F_1$ -ATPase aber eine hyperbolische Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Hemmstoffkonzentration auftritt. Weiterhin kann bei einem Vergleich der Hemmkonstanten angenommen werden, daß Chlorpromazin die Protonentranslokation nicht durch Wirkung auf den Cl^- -spezifischen Anionenkanal der Protonenpumpe hemmt ($K_i = 30 \mu\text{mol l}^{-1}$), da der Hemmstoff erst bei weit höheren Konzentrationen ($K_i = 150 \mu\text{mol l}^{-1}$) den Cl^- -Flux des Anionenkanals im Plasmalemma von Erythrocyten verhindert (MOTAIS et al., 1980). Schließlich ist für Polymyxin B ein breites Spektrum physiologischer Wirkungen bekannt, da die Substanz einerseits als Polykation elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Phospholipiden und andererseits hydrophobe Wechselwirkungen mit den apolaren Fettsäureketten der Phospholipidmembran eingeht (STORM et al., 1977).

4.4. Eine neue Hypothese zur molekularen Wirkung von Auxin

Wird trotz der kritischen Einschätzung hinsichtlich der Aussagekraft der Hemmstoffversuche weiterhin angenommen, daß eine Proteinkinase C die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen durch Proteinphosphorylierung stimuliert und Auxin diese Stimulation kontrolliert, dann stellt sich zwangsläufig die Frage nach dem offensichtlichen Zusammenhang zwischen der beobachteten Auxinwirkung und dem Mechanismus, mit dem in der Membran Diacylglycerol freigesetzt und metabolisiert wird. Dieses Lipid kommt nämlich als Strukturbaustein von Phospholipidmembranen weder in tierischen noch in pflanzlichen Zellen vor und tritt nur kurzzeitig als Zwischenprodukt im membrangebundenen Phospholipidmetabolismus der Zellen auf (BELL & COLEMAN, 1980; MOORE, 1982), wird aber nach den schon erwähnten Untersuchungen bei Ca^{2+} -Konzentration $<10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ im Cytosol von tierischen Zellen unbedingt als aktivierender Faktor für die Proteinkinase C benötigt (TAKAI et al., 1979b; KISHIMOTO et al., 1980).

Der Mechanismus, der in tierischen Zellen zur Freisetzung von Diacylglycerol in der Membran und damit zur Aktivierung der Proteinkinase C führt, ist weitgehend bekannt. Nach der Bindung von extrazellulären Signalstoffen wie bestimmten Neurotransmittern, Hormonen oder Wachstumsfaktoren an die entsprechenden spezifischen Rezeptoren am Plasmalemma setzt ein sehr schneller Abbau von Phosphatidylinositol (PI) zu Diacylglycerol in der Membran ein (MICHELL, 1975), so daß schließlich die Proteinkinase C aktiviert wird (NISHIZUKA, 1983). Der genannte Phospholipidabbau erfolgt wahrscheinlich durch die im Cytosol lokalisierte Phospholipase C (EC 3.1.4.10), die mit einer hohen Substratspezifität ausschließlich Phosphatidylinositol in Diacylglycerol und Inositolphosphat spaltet und nicht durch die in den Lysosomen lokalisierte Phospholi-

pase C (EC 3.1.4.3), die mit einer geringeren Substratspezifität Diacylglycerol bevorzugt aus Phosphatidylinositol aber auch aus anderen Phospholipiden freisetzt. Diese beiden Enzyme unterscheiden sich auch in weiteren Eigenschaften wie dem pH-Optimum, der Abhängigkeit von Metallkationen, der Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien und bestimmten Hemmstoffen (SHUKLA, 1982). Die Ergebnisse hinsichtlich der Ca^{2+} -Abhängigkeit der im Cytosol vorkommenden Phospholipase C (EC 3.1.4.10) sind noch widersprüchlich, doch könnte dies darauf beruhen, daß die Aktivität des Enzyms in der löslichen Form abhängig aber in der membrangebundenen Form unabhängig von Ca^{2+} ist (REBECCHI et al., 1983). Dagegen hat Ca^{2+} keinen Einfluß auf die Aktivität der Phospholipase C (EC 3.1.4.3), die im Lumen der Lysosomen als lösliches Enzym vorkommt (MATSUZAWA & HOSTETLER, 1980).

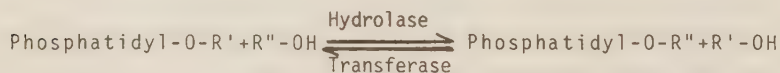
Im Gegensatz zu den zahlreichen Untersuchungen über den signalgesteuerten Abbau von Phosphatidylinositol und die dadurch stimulierbare Proteinphosphorylierung in tierischen Zellen findet sich in der Literatur bis jetzt kein direkter experimenteller Nachweis für das Vorkommen von ähnlichen Prozessen in pflanzlichen Zellen. Trotzdem laufen diese Prozesse vielleicht doch in Pflanzen ab, denn die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (EC 3.1.4.10) wurde als lösliches Enzym in Zellhomogenisaten von *Allium cepa*, *Apium graveolens*, *Brassica oleracea* und *Narcissus* sp. nachgewiesen, und für das Vorkommen des Enzyms wird sogar eine weite systematische Verbreitung im Pflanzenreich nicht ausgeschlossen (IRVINE et al., 1980). Allerdings wurde eine mögliche Regulation dieser Enzyme durch Auxin oder andere Phytohormone von den Autoren nicht untersucht. Das Enzym von *Apium graveolens* wurde näher charakterisiert, und es gleicht in den untersuchten Eigenschaften Substratspezifität, pH-Optimum, Ca^{2+} -Abhängigkeit, Sti-

mulation durch Phosphatidylsäure aber Hemmung durch Phosphatidylcholin der löslichen Phospholipase C im Cytosol von tierischen Zellen.

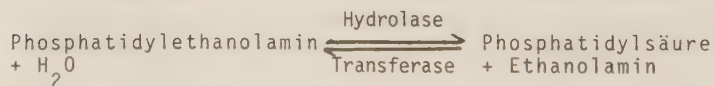
Nach den Untersuchungen in dieser Arbeit kommt eine membrangebundene Phospholipase C am E.R. von DC-Zellen vor. Dabei wurde die Aktivität des Enzyms nach der Methode von KURIOKA & MATSUDA (1979) über die Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC) in p-Nitrophenol und Cholinphosphat nachgewiesen. Diese Reaktion erfolgte in Anwesenheit des Phosphatase-Hemmstoffes Natriumorthovanadat, so daß eine Hydrolyse von NPPC einerseits durch die Aktivität von unspezifischen Phosphatasen (SRIVASTAVA et al., 1982) und andererseits durch die Phospholipase D, EC 3.1.4.4 (GUPTA & WOLD, 1980) ausgeschlossen werden kann. Die enzymatische Hydrolyse von NPPC durch die membrangebundene Phospholipase C aus DC-Zellen ist bei einem nahezu neutralen pH möglich und wird von Ca^{2+} nicht stimuliert. Mit diesen Eigenschaften gleicht das Enzym der membrangebundenen Phospholipase C im Cytosol von tierischen Zellen. Auxin stimuliert die Hydrolyse des künstlichen und in Wasser löslichen Substrats NPPC durch die Aktivität der membrangebundenen Phospholipase C nicht. Dieses Ergebnis schließt aber die Möglichkeit nicht aus, daß Auxin den spezifischen Abbau von membrangebundenem Phosphatidylinositol durch eine membrangebundene Phospholipase C kontrolliert. Ein erster experimenteller Hinweis für diese Annahme ist eine durch Auxin stimulierbare und von Ca^{2+} unabhängige Freisetzung von membrangebundenem Orthophosphat, die sich nur mit einer Hydrolyse von membrangebundenen Phospholipiden durch endogene Enzyme erklären läßt. Bei diesen Reaktionen werden Membranphospholipide durch membrangebundene lipolytische Enzyme wie die Phospholipase C (EC 3.1.4.10) oder die Phospholipase D (EC 3.1.4.4) hydrolysiert, und das Orthophosphat wird aus den Hydrolyseprodukten Inositol-

phosphat oder Phosphatidylsäure durch endogene Phosphatasen freigesetzt. Für das Vorkommen dieser Reaktionen spricht, daß in Anwesenheit der Phosphatasehemmstoffe Vanadat oder Molybdat eine Freisetzung von membrangebundenem Phosphat nicht erfolgt. Im übrigen wurde diese *in vitro*-Stimulation bei der Freisetzung von membrangebundenem Orthophosphat durch Auxin auch an isolierten Membranen von *Glycine max* gefunden, wobei für dieses Phänomen eine Interpretation von SCHERER & MORRÉ (1978) nicht angegeben wurde.

Das Ausmaß der Auxinstimulation bei der Freisetzung von membrangebundenem Orthophosphat nimmt in Anwesenheit von Ca^{2+} in millimolarer Konzentration zu, d.h. unter Bedingungen, die die Aktivität der Phospholipase D (EC 3.1.4.4) und das Ausmaß der hochaffinen Auxinbindung an Membranen des E.R. von DC-Zellen stimulieren. Damit stellt sich im Zusammenhang mit der hochaffinen Auxinbindung sowie mit der dadurch ausgelösten vermuteten Primärreaktion des Auxins, dem Abbau von membrangebundenem Phosphatidylinositol durch die Phospholipase C, die Frage nach den Eigenschaften und der physiologischen Funktion der Phospholipase D. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion und zeigt dabei, je nach Bedingung, Hydrolase- oder Transferaseaktivität:



Als spezifisches Beispiel sei hier angeführt:



Das Enzym wurde zuerst von HANAHAN & CHAIKOFF (1947) in Wurzelzellen von *Daucus carota*, dem Untersuchungsobjekt auch dieser Arbeit, eindeutig nachgewiesen. Inzwischen zeugen zahlreiche Untersuchungen von einem weitverbreiteten Vorkommen der Phospholipase D in einer löslichen und auch in einer membrangebundenen Form in den verschiedenen Zelltypen von höheren Pflanzen (HELLER, 1978). Nach ROUGHAN & SLACK (1976) kommt das membrangebundene Enzym als intrinsisches Protein in Membranen vor, die vor allem Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin enthalten. Folglich läßt sich eine hohe Phospholipase D-Aktivität am E.R. und damit in solchen Zellen nachweisen, die im Verhältnis zum E.R. kaum Chloroplasten enthalten; dem entspricht auch die hohe Enzymaktivität in den chlorophyllfreien DC-Zellen (KLEINIG & KOPP, 1978). Das Enzym baut bevorzugt Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin ab, bis 80 % dieser endogenen Substrate in der Membran verbraucht sind, während endogenes Phosphatidylglycerol in deutlich geringerem Ausmaß (20 %) enzymatisch abgebaut und Phosphatidylinositol, das Substrat der Phospholipase C, gar nicht angegriffen wird (ROUGHAN & SLACK, 1976). In dieser Arbeit wurde die Aktivität einer membrangebundenen Phospholipase D am E.R. von DC-Zellen über die Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC) entsprechend der Methode von GUPTA & WOLD (1980) nachgewiesen. Das Enzym spaltet p-Nitrophenylphosphorylcholin in Cholin und p-Nitrophenylphosphat, das von einer ebenfalls membrangebundenen unspezifischen Phosphatase zu p-Nitrophenol abgebaut wird. Auch bei Zusatz des künstlichen und wasserlöslichen Substrats p-Nitrophenylphosphorylcholin wird in Übereinstimmung mit den zahlreichen Literaturangaben die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der membrangebundenen Phospholipase D aus DC-Zellen auch erst bei millimolaren Konzentrationen von Ca^{2+} erreicht. Dabei läßt sich eine beträchtliche Enzymaktivität schon bei +2°C nachweisen. Eine vergleichbare Temperatur-

abhängigkeit der Phospholipase D-Aktivität wurde von HELLER et al. (1974) am isolierten Enzym aus *Arachis hypogaea* beobachtet. Die Hydrolyse von Phospholipiden fand selbst bei $\pm 0^{\circ}\text{C}$ statt und im Vergleich dazu bei $+ 30^{\circ}\text{C}$ mit einer fünffach erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit.

Eigentlich deutet die Aktivität der Phospholipase D über einen weiten Temperaturbereich auf eine wichtige zellbiologische Funktion des Enzyms und auf deren notwendige Aufrechterhaltung in Zellen höherer Pflanzen unabhängig von ihrer Umgebungstemperatur hin. Doch auf der Grundlage der bisher in der Literatur vorliegenden Untersuchungen ist die physiologische Funktion des Enzyms bisher noch weitgehend unverstanden (HELLER, 1978). Zudem wurde das Vorkommen eines Enzyms mit Phospholipase D-Aktivität von ROUGHAN & SLACK (1976) sogar angezweifelt. Die Autoren vermuteten, daß die Phospholipase D ein Strukturprotein von Membranen mit einer Zusammensetzung vor allem aus Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin ist, das unter bestimmten aber unphysiologischen Bedingungen enzymatische Eigenschaften zeigt. Als physiologische Funktion des Proteins wurde stattdessen angenommen, in Membranen die Bindungsstelle für Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin zu sein und damit als genetische Kontrolle für den Einbau dieser Phospholipide in neusynthetisierte Membranen verantwortlich zu sein. Auch die mögliche Funktion der Phospholipase D beim Abbau von Phospholipiden in Membranen wird diskutiert, da es auffällt, daß Pflanzenzellen mit einem hohen Gehalt an Phospholipase D nur geringe Mengen an lipolytischen Acylhydrolasen enthalten bzw. solche mit hoher Aktivität von Acylhydrolasen kaum Phospholipidabbau durch die Phospholipase D zeigen (HERMAN & CHRISPEELS, 1980). Schließlich formulierten YANG et al. (1967) die Hypothese, daß die Hydrolyse- bzw. Transferaseaktivität der Phospholipase D an Membranphospholipiden zu einer Veränderung der Lipid-

Protein-Wechselwirkungen führt, die die Funktion von bestimmten Membraneigenschaften und die Aktivität von membrangebundenen Enzymen beeinflussen. Da die Hydrolyse von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin durch das Enzym eine Ladungsänderung der Membran bewirkt, könnten auch Ionenbindungs- und vor allem Ionentransporteigenschaften der Membran verändert werden.

Diese Hypothese wird auch durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit unterstützt, denn für die physiologische Funktion der Phospholipase D am E.R. von DC-Zellen ergibt sich folgendes Bild. Die hydrolytische Aktivität des Enzyms führt zu einem Abbau von zwitterionischen Phospholipiden, nämlich Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin und damit zu einer Anreicherung der anionischen Phosphatidylsäure. Dieses Phospholipid ist die Ausgangssubstanz im CDP-Diacylglycerol-Stoffwechselweg für die am E.R. lokalisierte Synthese von weiteren anionischen Phospholipiden wie Phosphatidylinositol und Phosphatidylglycerol (MOORE, 1982). Die Anreicherung von Phosphatidylsäure sowie die mögliche Synthese von anionischen aus zwitterionischen Phospholipiden bewirken eine Verstärkung der negativen Ladung der Membran, so daß Metallkationen, insbesondere Ca^{2+} gebunden werden können (HAUSER & PHILLIPS, 1979). Beide Prozesse, die Änderung der Phospholipidzusammensetzung als auch die Ca^{2+} -Bindung, ermöglichen letztlich eine lokale Erniedrigung der Membranfluidität, die offensichtlich die Voraussetzung für die Bindung des Auxins an die hochaffinen Auxinbindungsstellen ist. Diese Interpretation stimmt auch mit der an früherer Stelle schon diskutierten Beobachtung überein, daß bestimmte organische Lösungsmittel, die die Membranfluidität erhöhen, die Ausbildung der hochaffinen Auxinbindung verhindern.

Entsprechend der Hormonrezeptorhypothese bedeutet diese Interpretation aber auch, daß die Aktivität der Phospholipase D und die dadurch veränderten Membraneigenschaften die auxinkontrollierte Primärreaktion, den Abbau von Phosphatidylinositol durch die Phospholipase C ermöglichen. Für diese Vorstellung sprechen auch die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Phospholipase C, daß die Aktivität des Enzyms in pflanzlichen und in tierischen Zellen von der Zusammensetzung der Phospholipidmembranen beeinflußt wird. So wird die Aktivität der Phospholipase C aus *Apium graveolens* bei einem hohen molaren Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Phosphatidylinositol, das charakteristisch für native cytoplasmatische Phospholipidmembranen ist (HARWOOD, 1980), gehemmt aber durch Phosphatidylsäure stimuliert (IRVINE et al., 1980). Auch von der Phospholipase C im Cytosol von tierischen Zellen ist bekannt, daß Phosphatidylcholin die Aktivität des Enzyms hemmt und diese Hemmung durch anionische Phospholipide aufgehoben werden kann (HOFMANN & MAJERUS, 1982). Dies bedeutet für die physiologische Funktion der Phospholipase D, daß die Aktivität des Enzyms Membraneigenschaften wie die Phospholipidzusammensetzung und die elektrische Ladung lokal so verändert, daß dann bestimmte membrangebundene Funktionen ablaufen können. Im Falle der Membranen des E.R. aus DC-Zellen sind diese Funktionen die hochaffine Auxinbindung und die dadurch ausgelöste Primärreaktion des Auxins, die enzymatische Hydrolyse von membrangebundenem Phosphatidylinositol durch die Aktivität der Phospholipase C. Diese Reaktion läßt sich, wie schon erwähnt, auch als auxinstimulierbare Freisetzung von membrangebundenem Orthophosphat nachweisen. Das Ausmaß der Auxinstimulation dieser Reaktion ist bei einer millimolaren Konzentration von Ca^{2+} , der optimalen Bedingung für die *in vitro*-Aktivität der Phospholipase D, wesentlich größer als bei einer mikromolaren Konzentration von Ca^{2+} .

bei gleichzeitiger Anwesenheit von Calmodulin. Die letztgenannten *in vitro*-Bedingungen entsprechen aber auch nicht dem physiologischen Milieu in der Pflanzenzelle, denn es fehlen u.a. die Nukleotide und die Vorstufen für die Phospholipidsynthese am E.R.. Folglich kann erst in Experimenten mit einer Methodik, bei der die Auxinwirkung auf die enzymatische Hydrolyse von zuvor radioaktiv markierten Phospholipiden in der Pflanzenzelle *in vivo* sowie an isolierten Membranen *in vitro* vergleichend analysiert wird, geklärt werden, ob der vorgeschlagene Mechanismus einer Kopplung der Enzymaktivitäten von Phospholipase D und Phospholipase C in der Pflanzenzelle auch *in vivo* abläuft.

Weitere Hinweise in der Literatur für das Vorkommen der auxinstimulierbaren Hydrolyse von membrangebundenem Phosphatidylinositol durch die Phospholipase C in Pflanzenzellen könnten die Ergebnisse von BUCKHOUT et al. (1980, 1981) sein. Diese Autoren beobachteten an isolierten Membranen aus Hypokotylzellen von *Glycine max*, daß Auxin in physiologischen Konzentrationen membrangebundene zweiwertige Metallkationen, insbesondere Ca^{2+} aus der Membran freisetzt. Zwar beschreiben die Autoren das Phänomen dieser Auxinwirkung, aber für seinen Mechanismus geben sie keine Interpretation an. Es ist aber durch zahlreiche Untersuchungen an synthetischen Modellmembranen bekannt, daß anionische Phospholipide Metallkationen binden (HAUSER & PHILLIPS, 1979). Hier interessieren vor allem die Untersuchungen, die zeigen, daß Phosphatidylinositol Ca^{2+} bindet, wobei das Phospholipid in wässriger Dispersion (ABRAMSON et al., 1968) oder als einschichtiger molekularer Film (HAUSER et al., 1969) vorliegen kann. Dagegen sind die Spezifität und die Affinität von Ca^{2+} -Bindungsstellen an Phospholipidmembranen lebender Zellen im einzelnen oft noch nicht geklärt, auch wenn es u.a. experimentell gezeigt wurde, daß Ca^{2+} an Phosphatidylinositol des Plasmalemma von Erythrocyten bindet (BUCKLEY &

HAWTHORNE, 1972) und daß die Ca^{2+} -Bindung am isolierten Sarkolemma aus Herzmuskelzellen vom Phosphatidylinositolgehalt der Membran abhängt (PHILIPSON et al., 1980). Nach MICHELL (1982) führt in tierischen Zellen die Bindung von bestimmten Signalstoffen an ihre spezifischen Rezeptoren zur Aktivierung der Phospholipase C, so daß Ca^{2+} -bindendes Phosphatidylinositol in der Membran gespalten wird und dabei membrangebundenes Diacylglycerol sowie lösliches Inositolphosphat und Ca^{2+} freigesetzt werden. Die wesentlichen Funktionselemente für diesen Mechanismus kommen offensichtlich auch in pflanzlichen Zellen vor, nämlich membrangebundenes Phosphatidylinositol, die Phospholipase C und hochaffine Bindungsstellen für Auxin, einem spezifischen Signalstoff der Pflanzenzelle. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von BUCKHOUT et al. (1980, 1981), die die auxinabhängige Freisetzung von membrangebundenem Ca^{2+} beschreiben, ein weiterer Hinweis für das Zusammenwirken der genannten Funktionselemente in der Pflanzenzelle.

Mit diesen und den zuvor angeführten Hinweisen auf das Vorkommen einer auxinkontrollierten Phospholipase C läßt sich folgender Mechanismus auxinkontrollierter Primärreaktionen in der Pflanzenzelle vorstellen: Auxin kontrolliert über die Hydrolyse von membrangebundenem Phosphatidylinositol durch die Phospholipase C die Freisetzung von membrangebundenem Diacylglycerol. Dieses Lipid ist, wie schon erwähnt wurde, als *second messenger* die funktionelle Voraussetzung für die Aktivität der Proteinkinase C. Dies bedeutet, Auxin löst nach Bindung an seinen Rezeptor eine spezifische Hydrolyse von Phosphatidylinositol aus, die die Phosphorylierung von Proteinen durch die Proteinkinase C ermöglicht. Diese Vorstellung zur molekularen Wirkung des Auxins wird durch eine noch unveröffentlichte Untersuchung experimentell bestätigt, in der erstmals ein auxinkontrollierter Abbau von membrangebundenem Phosphatidylinositol (durch die Phospholipase C?) und eine davon abhängige

Proteinphosphorylierung (durch die Proteinkinase C?) festgestellt wurde (MORRÉ, 1983; persönliche Mitteilung). Dieses Ergebnis sowie die zuvor angeführten experimentellen Hinweise lassen vermuten, daß tierische und pflanzliche Zellen zwar mit unterschiedlichen, d.h. für sie spezifischen Signalstoffen und deren Rezeptoren ausgestattet sind aber trotzdem zumindest über einen vergleichbaren Mechanismus der Signalverarbeitung verfügen, nämlich den Phosphatidylinositolzyklus mit den davon abhängigen Prozessen der signalgesteuerten Ca^{2+} -Mobilisierung (MICHELL, 1975; 1982) und der signalgesteuerten Proteinphorylierung (NISHIZUKA, 1983).

Der Phosphatidylinositolzyklus umfaßt die enzymatischen Reaktionen der Hydrolyse des membrangebundenen Phosphatidylinositols und der anschließenden Resynthese des Phospholipids. In tierischen Zellen sind am Ablauf des Phosphatidylinositolzyklus zwei Membransysteme beteiligt, das Plasmalemma und das E.R. (LAPETINA & MICHELL, 1973). Nach Bindung eines Signalstoffes an seinen spezifischen Rezeptor am Plasmalemma wird die Phospholipase C (EC 3.1.4.10) aktiviert, die Phosphatidylinositol spaltet und dabei Inositolmonophosphat und Diacylglycerol freisetzt. Diacylglycerol wird sofort unter Verbrauch von ATP durch die Diacylglycerolkinase (EC 2.7.1.-) zu Phosphatidylsäure umgesetzt. Dieses Phospholipid wird vermutlich über spezifische Transferproteine im Cytosol vom Plasmalemma zum E.R. transportiert, der intrazellulären Membran mit der Fähigkeit der Phospholipidsynthese. Am E.R. wird aus Phosphatidylsäure durch die Reaktion von zwei Enzymen, nämlich der CTP-Phosphatidyltransferase (EC 2.7.7.41) und der CDP-Diacylglycerolmyo-inositol-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.11) Phosphatidylinositol gebildet. Resynthetisiertes Phosphatidylinositol wird über spezifische Transferproteine im Cytosol vom E.R. zum Plasmalemma transportiert und dort in die Membran eingebaut.

Im Unterschied zu der Situation bei den tierischen findet bei den pflanzlichen Zellen vermutlich eine räumliche Trennung der signalgesteuerten Hydrolyse und der anschließenden Resynthese von Phosphatidylinositol nicht statt. Denn nach den Ergebnissen dieser und auch anderer Untersuchungen sind in pflanzlichen Zellen am E.R. hochaffine Bindungsstellen für Auxin lokalisiert, die offensichtlich keine Funktion für den polaren und aktiven Transport von Auxin durch die Zellen besitzen (HERTEL, 1981; RUBERY, 1981) und für die nach den Ergebnissen dieser Arbeit und in Auswertung der zitierten Literaturhinweise als Funktion eine Kontrolle einer am E.R. lokalisierten Phospholipase C angenommen wird. Zudem ist für folgende am Ablauf des Phosphatidylinositol-Zyklus beteiligten Enzyme die Lokalisation am E.R. in Pflanzenzellen nachgewiesen: CTP-Phosphatidylcytidyltransferase (EC 2.7.7.41) und CDP-Diacylglycerol-myo-inositol-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.11) (MOORE, 1982). Das bei der Hydrolyse von Phosphatidylinositol freigesetzte Diacylglycerol kommt als Folge seiner schnellen Metabolisierung als Strukturbaustein in Phospholipidmembranen nicht vor, und seine Phosphorylierung zu Phosphatidylsäure durch eine am E.R. lokalisierte Diacylglycerolkinase (EC 2.7.1.-) ist sehr wahrscheinlich.

Nach der vorgeschlagenen Hypothese zur molekularen Wirkung von Auxin löst die Besetzung von hochaffinen Bindungsstellen mit dem Phytohormon nicht nur den Ablauf des Phosphatidylinositolzyklus in der Pflanzenzelle aus, sondern auch die davon abhängigen Prozesse der Proteinphosphorylierung und der Ca^{2+} -Mobilisierung. Der Mechanismus der auxin-kontrollierten Proteinphosphorylierung wurde schon eingehend diskutiert. An dieser Stelle soll nur noch auf den Prozeß der Ca^{2+} -Mobilisierung eingegangen werden, der sich in tierischen Zellen offensichtlich aus zwei verschiedenen Mechanismen zusammensetzt. Der erste Mechanismus betrifft die schon erwähnte Freisetzung von membrangebundenem

Ca^{2+} und ist eine Folge des lokalen und kurzfristigen Abbaus des anionischen und Ca^{2+} -bindenden Phosphatidylinositols in der Membran. Der zweite Mechanismus beruht auf der Eigenschaft der Phosphatidylsäure, einem Metaboliten im Phosphatidylinositolzyklus, als Ionophor Ca^{2+} zu binden und zu transportieren. Die Phosphatidylsäure zeigt diese ionophore Eigenschaft für Ca^{2+} sowohl *in vitro* in der Pressman-Zelle (TYSON et al., 1976) und an Liposomen (SERHAN et al., 1981, 1982) als auch *in vivo* an nativen Phospholipidmembranen von tierischen Zellen (PUTNEY et al., 1980; IMAI et al., 1982; SOMMERMEYER et al., 1983). Für die pflanzliche Zelle wurde bisher nach Auxineinwirkung nur die schon erwähnte Freisetzung von membrangebundenem Ca^{2+} vermutlich als Folge des Abbaus von Phosphatidylinositol nachgewiesen (BUCKHOUT et al., 1980, 1981). Es ist aber möglich, daß der von einigen Autoren (HAGER & HERMSDORF, 1981; RASI-CALDOGNO et al., 1982; FUKUMOTO & NAGAI, 1982; ZBELL, unveröffentlicht) an intrazellulären Membranen von pflanzlichen Zellen festgestellte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiport auf der ionophoren Wirkung von endogener Phosphatidylsäure in der Membran beruht, zumal ein $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiport *in vitro* in der Pressman-Zelle für Cardiolipin, einem Phospholipid, das gleichartige ionophore Eigenschaften wie die Phosphatidylsäure besitzt, nachgewiesen wurde (TYSON et al., 1976). Aus diesen Ausführungen wird ersichtlich, daß es an pflanzlichen Zellen noch umfangreicher Untersuchungen zu den einzelnen Reaktionsschritten des Phosphatidylinositolzyklus und zu der davon abhängigen Ca^{2+} -Mobilisierung und Proteinphosphorylierung bedarf, um die vorgeschlagene Hypothese der molekularen Wirkung von Auxin durch Experimente absichern zu können. Vor allem sollte zunächst durch gezielte Experimente die hypothetische Primärreaktion des Auxins, die Hydrolyse von membrangebundenem Phosphatidylinositol durch die Phospholipase C, sowohl an Membranen des E.R. von DC-Zellen nachgewiesen als auch an intrazellulären Membranen aus Zellen anderer pflanzlicher Objekte mit nachgewiesenem Auxinsystem ihre systematische Verbreitung abgesichert werden.

Trotz dieser zweifelsohne augenblicklich noch vorhandenen Schwächen in der experimentellen Absicherung ermöglicht die vorgeschlagene Hypothese zur molekularen Wirkung von Auxin es erstmals, das aus der Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der höheren Pflanzen bekannte Phänomen der multiplen Wirkung von Auxin auf molekularbiologischer Ebene zu erfassen, durch gezielte Experimente zu untersuchen und dadurch in Zukunft vielleicht sogar zu erklären. Im Vergleich zu den bisher in der Literatur bekannten Vorstellungen beschreibt die in dieser Arbeit entwickelte Hypothese einen neuartigen Mechanismus von letztlich durch Auxin kontrollierbaren hierarchisch angeordneten Reaktionen, deren Ablauf in der Pflanzenzelle zudem eine enorme Verstärkung des empfangenen Signals Auxin bedeutet. Eine definierte und spezifische Primärreaktion des interzellulären Signalstoffes Auxin führt zur Bildung von intrazellulären Signalstoffen, die als "*second messenger*" bestimmte Sekundärreaktionen ermöglichen. Diese Sekundärreaktionen sind selbst Schlüsselreaktionen mit Kontrollfunktionen, die dadurch ein breites Spektrum untergeordneter Folgereaktionen in der Pflanzenzelle ermöglichen oder verhindern. In ihrer Gesamtheit bilden die Folgereaktionen die komplexen zellulären Prozesse, die seit langem in der Physiologie als makroskopisch sichtbare Phänomene der Auxinwirkung bei höheren Pflanzen bekannt sind.

Die hypothetische, durch Auxin kontrollierte Primärreaktion ist die Hydrolyse von membrangebundenem Phosphatidylinositol durch die Phospholipase C und der dadurch ausgelöste Ablauf des Phosphatidylinositolzyklus, der lokale und kurzzeitige Änderungen der Membraneigenschaften Lipidzusammensetzung, Ladung, Fluidität und Permeabilität bewirkt (Abb. 59). In Anwendung des *metamorphic mosaic*-Modells biologischer Membranen (CULLIS & DE KRUIJFF, 1979; CULLIS et al., 1980) führt die Primärreaktion des Auxins zu Änderungen im Lipidpolymorphismus der Membran, so daß

bestimmte Sekundärreaktionen des Auxins direkt durch die Membranlipide aktiviert werden. Als Folge der Primärreaktion des Auxins, der Aktivierung der Phospholipase C, werden in der Membran die *second messenger* Diacylglycerol und Ca^{2+} freigesetzt. Die von Diacylglycerol abhängige Reaktion ist die Proteinphosphorylierung durch die Proteinkinase C, die die Aktivität von membrangebunden Enzymen wie die der an Membranen des E.R. lokalisierten anionenstimulierbaren Protonenpumpe kontrolliert. Der *second messenger* Ca^{2+} wirkt sicherlich über das Ca^{2+} -bindende Protein CaM und kontrolliert so Enzyme, deren Aktivität von Ca^{2+} /CaM stimuliert wird (MARMÉ, 1983). Zu diesen Ca^{2+} /CaM-abhängigen Enzymen zählen die NAD^{+} -Kinase (ANDERSON & CORMIER, 1978), die Ca^{2+} -Transport-ATPase am Plasmalemma (DIETER & MARMÉ, 1980, 1981) eine Proteinkinase (HETHERINGTON & TREWAVAS, 1982 ; POLYA & DAVIES, 1982) und eine Phosphoproteinphosphatase (ZBELL, diese Arbeit). Schließlich kann in Abhängigkeit von Ca^{2+} /CaM über den Mechanismus der reversiblen Proteinphosphorylierung die Aktivität weiterer Enzyme wie z.B. die der Chinon: NAD^{+} -oxidoreduktase durch die Proteinkinase (GRAZIANA et al., 1983) oder die der anionenstimulierbaren Protonenpumpe durch die Phosphoproteinphosphatase (ZBELL, diese Arbeit) kontrolliert werden. Der *second messenger* Ca^{2+} kann aber noch durch einen alternativen Mechanismus mobilisiert werden, denn bei dem durch Auxin auslösbaren Ablauf des Phosphatidylinositolzyklus tritt im Prozeß der Resynthese von Phosphatidylinositol der Metabolit Phosphatidylsäure mit ionophoren Eigenschaften für Ca^{2+} in der Membran auf. Dabei ist zu beobachten, daß die Aktivität der Protonenpumpe über den Mechanismus des Ca^{2+} /H⁺-Antiports eine Verlagerung von Ca^{2+} aus dem Cytosol in das Lumen des E.R. bewirkt und somit ein Ca^{2+} -Efflux nur dann möglich ist, wenn die Protonenpumpe nicht aktiv oder nicht vorhanden ist und zuvor schon eine Ca^{2+} -Akkumulation im Lumen des E.R. stattgefunden hat.

Diese Aufstellung von möglichen auxinkontrollierten Sekundär- und Folgereaktionen verdeutlicht weitere Prinzipien im Wirkungsmechanismus von Auxin. Die Spezifität der Auxinwirkung ist sicherlich von der physiologischen Kompetenz, d.h. auch von der differentiellen Genexpression der einzelnen Pflanzenzelle abhängig. Dabei löst Auxin offensichtlich nur noch den Ablauf von in der Zelle schon ausgebildeten Funktionen und Mechanismen aus. Kennzeichnend für den Ablauf der genannten Sekundär- und Folgereaktion ist eine Kopplung des interzellulären Signals Auxin mit dem intrazellulären Signal Ca^{2+} . Diese Wechselwirkung zwischen Auxin und Ca^{2+} kommt in höheren Pflanzen auch bei physiologischen Prozessen mit einem unterschiedlichen Grad an Komplexität vor, wird aber in den einzelnen molekularen Reaktionen der Prozesse augenblicklich noch nicht verstanden. Zu diesen Prozessen könnten u.a. zählen: die Mitose (PEAUD-LENOËL, 1977; HEPLER, 1980; WICK & HEPLER, 1980; EVERETT et al., 1981) die Exocytose (RAY, 1977; MORRIS & NORTHCOLE, 1977; GRIFFING & RAY, 1979; BELITSER et al., 1982), das Streckungswachstum (RAY, 1977; GRIFFING & RAY, 1979) und der Gravitropismus (SLOCUM & ROUX, 1983; WRIGHT & RAYLE, 1983; LEE et al., 1983).

Schließlich paßt die in dieser Arbeit entwickelte Hypothese zum molekularen Mechanismus der Auxinwirkung recht gut zu den gegenwärtigen Vorstellungen zum molekularen Mechanismus des Auxintransports. Danach sind im Plasmalemma zwei Transportstellen, die sich in ihren Funktionen unterscheiden, für den polaren und aktiven Auxintransport in Pflanzenzellen verantwortlich. Der Influx von Auxin wird durch spezifische Transportstellen mit der Funktion eines Symports von Protonen und Auxinanionen durchgeführt (RUBERY, 1977, 1978; SUSSMAN & GOLDSMITH, 1981 a,b; HERTEL et al., 1983), während der Efflux von Auxin durch spezifische Transportstellen mit der Funktion

eines elektrogenen Carriers für Auxinanionen erfolgt (HERTEL & LEOPOLD, 1963; HERTEL & FLORY, 1968; HERTEL et al., 1969; GOLDSMITH & RAY, 1973; GOLDSMITH, 1982). Bei einer gleichmäßigen Verteilung der Transportstellen für den Influx über die Gesamtfläche des Plasmalemma sowie bei einer polaren Lokalisation der Transportstellen für den Efflux im Plasmalemma am basalen Teil der Pflanzenzelle (JACOBS & GILBERT, 1983) ermöglicht ein chemiosmotischer Transportmechanismus unter Nutzung eines energieabhängigen pH-Gradienten am Plasmalemma den polaren und aktiven Auxintransport (RUBERY & SHELDRAKE, 1974; RAVEN, 1975; RUBERY, 1978; EDWARDS & GOLDSMITH, 1980). Dies bedeutet, daß der Signalstoff Auxin unter Energieaufwand die Pflanzenzellen gerichtet durchströmt und nur in den Pflanzenzellen Wachstum- und Differenzierungsprozesse auslöst, in denen an intrazellulären Membranen wie am E.R. und vielleicht auch am Tonoplasten die die Primärreaktion kontrollierenden Auxinrezeptoren vorkommen (Abb. 60). Ein solches Zusammenspiel von Auxintransport und Auxinwirkung könnte auch beinhalten, daß die Diskriminierung der Signalstoffe, d.h. die Spezifität der Signalerkennung durch die Pflanzenzelle am Plasmalemma im Prozeß des Auxintransports und nicht an den intrazellulären Membranen bei der Primärreaktion erfolgt. Mit diesem Mechanismus läßt sich sogar die in dieser Arbeit beschriebene offensichtlich geringe Auxinspezifität bei der *in vitro*-Stimulation der anionenstimulierbaren Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen erklären. Das komplexe Wirkungssystem von Auxin, bestehend aus den Funktionen des Hormontransports und der Hormonwirkung, könnte außerdem das Phänomen hervorrufen, daß sich die Dosis-Effekt-Kurven der *in vitro*-Auxinbindung und der *in vivo*-Auxinwirkung, z.B. des auxinkontrollierten Streckungswachstums, unterscheiden (RAY et al., 1977 b).

Auch der Befund von JACOBS & TAIZ (1980), daß Natriumorthovanadat die Auxinstimulation der Protonensekretion und des Streckungswachstums bei Epikotylen von *Pisum sativum* und bei Koleoptilen von *Avena sativa* hemmt, läßt sich mit dem Zusammenspiel von Hormontransport und Hormonwirkung interpretieren. Vanadat hemmt nämlich die am Plasmalemma lokalisierten protonentranslozierenden ATPasen. Diese Enzyme weisen im Reaktionsmechanismus bei der ATP-Hydrolyse einen intermediären Phosphorylierungsschritt auf, der von Vanadat blockiert wird (BRISKIN & LEONARD, 1982; BRISKIN & POOLE, 1983; SCALLA et al., 1983; VARA & SERRANO, 1983). Diese Hemmung der Protonentranslokation führt zu einem Verlust des Protonengradienten am Plasmalemma, so daß Auxin über den chemiosmotischen Transportmechanismus von den Zellen nicht mehr aufgenommen und weitergeleitet werden kann. Dies bewirkt letztlich, daß die Stimulation der am E.R. lokalisierten vanadatunempfindlichen protonentranslozierenden ATPasen durch Auxin unterbleibt und die für das Streckungswachstum notwendige Protonensekretion über den "bucket-brigade-mechanism" (RAY, 1977) nicht erfolgt. Die Lokalisation der Auxinwirkung innerhalb der Zelle und nicht am Plasmalemma wird auch von CLELAND (1983) angenommen, obwohl nach seiner Ansicht die für das Streckungswachstum notwendige protonentranslozierende ATPase am Plasmalemma lokalisiert sein soll.

4.5. Ausblick

"It is not uncommon to see rapid scientific advances precipitated simply by a new perspective on an old problem. Early observations, forgotten or perhaps even deliberately ignored, suddenly acquire new significance in the light of new knowledge."

NJUS & RADDÀ (1978)

Die in dieser Arbeit durch die Auswertung von experimentellen Daten der eigenen und fremden Untersuchungen entwickelte Hypothese zur molekularen Wirkung von Auxin in pflanzlichen Zellen erklärt offensichtlich die funktionalen Zusammenhänge von bekannten physiologischen Phänomenen, die bisher bei einer zusammenfassenden Betrachtung oft widersprüchlich erschienen. Es bedarf aber weiterer Untersuchungen, um bestimmte Aussagen der Hypothese experimentell zu überprüfen und als Folge dieser Erkenntnisse die Hypothese vielleicht zu korrigieren und weiter zu entwickeln. Auf jeden Fall stellt die Hypothese eine neue theoretische Grundlage für die Konzeption von zukünftigen Experimenten dar, um komplexe physiologische Prozesse der Pflanzen wie das Wachstum und die Differenzierung, an denen Auxin als endogener Regulationsfaktor beteiligt ist, zu untersuchen. Sollten diese Untersuchungen den vorgeschlagenen Mechanismus der molekularen Wirkung von Auxin in pflanzlichen Zellen bestätigen, würde dies zeigen, daß pflanzliche und tierische Zellen trotz der Unterschiede bei den Signalstoffen über ähnliche Mechanismen der Signalverarbeitung verfügen. Dies könnte dann bedeuten, daß bestimmte Mechanismen der Signalverarbeitung für die Eukaryontenzellen typische, d.h. auch phylogenetisch sehr alte Prozesse darstellen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das zellbiologische Problem der molekularen Wirkung von Auxin in Pflanzenzellen untersucht. Das Objekt für diese Untersuchungen waren DC-Zellen, das sind *in vitro* kultivierte Zellen von *Daucus carota* L., deren Wachstum und Differenzierung sich durch Auxin kontrollieren läßt. Die theoretischen Grundlagen für die Formulierung der experimentellen Fragestellungen waren die Aussagen einerseits der Hormonrezeptorhypothese und andererseits die einer Hypothese zur Primärwirkung des Hormons, nämlich daß Auxin eine membrangebundene Protonenpumpe stimuliert. Für die biochemischen Untersuchungen zu dieser Thematik wurden subzelluläre Membranfraktionen aus DC-Zellen isoliert. Die Eigenschaft der Membranen, *in vitro* Auxin zu binden, konnte unter Verwendung von radioaktiv markiertem Auxin mit der Methode des Sedimentationstests nachgewiesen werden. Eine ATP-abhängige Protonentranslokation, die *in vitro* zu einer Ansäuerung des Lumens der zu Vesikeln geschlossenen Membranen führte, ließ sich über die Absorptionsänderungen des pH-Indikators Neutralrot photometrisch messen. Die Untersuchungen zeigten folgende Ergebnisse:

- 1.) An den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (E.R.) sind diskrete Bindungsstellen für Auxin lokalisiert, deren Dissoziationskonstante $K_D < 500 \text{ nmol l}^{-1}$ und Anzahl $n < 5 \text{ pmol g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen betragen. Diese Bindungsstellen binden die Auxinmoleküle als Anionen, und die Bindungsreaktion ist von einem bestimmten Fluiditätszustand der Membran abhängig. Ca^{2+} in millimolaren Konzentrationen sowie eine Erhöhung der Inkubationstemperatur (ΔT) stimulieren die Auxinbindung. Da Ca^{2+} und ΔT bekanntlich auf die Membranfluidität antagonistisch wirken, wird angenommen, daß die synergistische Wirkung von Ca^{2+} und ΔT auf die Auxinbindung von einer Ca^{2+} -

abhängigen Enzymreaktion in der Membran hervorgerufen wird. Dieses Enzym ist offensichtlich die Phospholipase D (EC 3.1.4.4), die durch lokale Hydrolyse von bestimmten Phospholipiden die Membraneigenschaften so verändert, daß Auxin an der Bindungsstelle gebunden werden kann.

2.) Die Membranen des E.R. enthalten Cl^- -stimulierbare Protonenpumpen, die sich aus einer protonentranslozierenden ATPase (EC 3.6.1.3) und einem offensichtlich über das Membranpotential ($\Delta\psi$) gekoppelten Cl^- -Kanal zusammensetzen. Eine Ansäuerung des Lumens des E.R. (ΔpH) findet nur bei einer ungestörten Funktion des H^+/Cl^- -Symports statt. Die protonentranslozierende ATPase kennzeichnet eine ausgeprägte Spezifität für das Energiesubstrat $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ ($K_m = 1 \text{ mmol l}^{-1}$). Aufgrund seiner Hemmstoffcharakteristik wird für das Enzym der Struktur- und Funktionstyp einer modifizierten $\text{F}_0 \cdot \text{F}_1$ -ATPase angenommen. Mit der Ausnahme von F^- besitzt der Anionenkanal eine Ionenselektivität für die Halogenidionen Cl^- , Br^- und J^- . Mit diesen Eigenschaften gleicht die anionenstimulierbare Protonenpumpe am E.R. von DC-Zellen den Enzymen, die in tierischen Zellen an intrazellulären Membranen von exocytotischen Vesikeln vorkommen.

3.) Die Aktivität der Protonenpumpe am E.R. wird durch einen Antagonismus von Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) und Auxin über den Mechanismus der reversiblen Proteinphosphorylierung reguliert. Dabei stimuliert Ca^{2+} /CaM eine Phosphoproteinphosphatase (EC 3.1.3.16), die durch Dephosphorylierung der Protonenpumpe den energieabhängigen Aufbau des pH-Gradienten (ΔpH) an der Membran des E.R. verhindert. Auxin kann diese Hemmung durch die Aktivierung einer Proteinkinase (EC 2.7.1.37), die die Protonenpumpe phosphoryliert, aufheben.

- 4.) Folglich ist die Stimulation der Protonenpumpe am E.R. durch Auxin nicht die vermutete Primärwirkung des Hormons. Es wird stattdessen angenommen, daß die Primärwirkung von Auxin die Stimulation einer am E.R. lokalisierten Phospholipase C (EC 3.1.4.10) ist, die aus membrangebundenem Phosphatidylinositol (PI) Diacylglycerol, den stimulierenden Faktor für die Proteinkinase freisetzt. Mit diesen Reaktionen scheint am E.R. in DC-Zellen ein Mechanismus der Signalverarbeitung abzulaufen, der auch in tierischen Zellen systematisch weitverbreitet vorkommt und als signalgesteuerter Ablauf des PI-Zyklus mit anschließender Proteinphosphorylierung bekannt ist. Die Bedeutung dieser neuen Hypothese zur molekularen Wirkung von Auxin wird im Zusammenhang mit den aus der Literatur bekannten Erkenntnissen über den Auxintransport für die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge von Pflanzen diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- ABRAMSON, M.B., COLACICCO, G., CURCI, R. & RAPPORT, M.M. (1968). Ionic properties of acidic lipids. Phosphatidylinositol. Biochemistry 7, 1692-1698.
- ADMON, A., JACOBY, B., & GOLDSCHMIDT, E.E. (1981). Some characteristics of the Mg-ATPase of isolated red beet vacuoles. Plant Sci. Lett. 22, 89-96.
- ÅKERMAN, K.E.O. (1982). Ca^{2+} transport and cell activation. Med. Biol. 60, 168-182.
- ANDERSON, J.M., CHARBONNEAU, H., JONES, H.P., MC CANN, R.O. & CORMIER, M.J. (1980). Characterization of the plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. Biochemistry 19, 3113-3120.
- ANDERSON, J.M. & CORMIER, M.J. (1978). Calcium-dependent regulator of NAD-kinase in higher plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 595-602.
- APPS, D.K. & GLOVER, L.A. (1978). Isolation and characterization of magnesium adenosine triphosphatase from the chromaffin granule membrane. FEBS Lett. 85, 254-258.
- APPS, D.K. & SCHATZ, G. (1979). An adenosine triphosphatase isolated from chromaffin-granule membranes is closely similar to F_1 -adenosine triphosphatase of mitochondria. Eur. J. Biochem. 100, 411-419.
- BACKS-HÜSEMANN, D. (1972). Steuerung der Morphogenese in Kalluskulturen und Embryobildung aus Einzelzellen von *Daucus carota*. Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin.

- BALKE, N.E. & HODGES, T.K. (1979). Inhibition of adenosine triphosphatase activity of the plasma membrane fraction of oat roots by diethylstilbesterol. *Plant Physiol.* 63, 48-52.
- BATT, S. & VENIS, M.A. (1976). Separation and localization of two classes of auxin binding sites in corn coleoptile membranes. *Planta* 130, 15-21.
- BAYER, M.H. & ŠŮNKA, J. (1976). The effect of indoleacetic acid on pH in mesophyll protoplast suspensions of *Vicia faba* L. Direct and continuous measurements. *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 271-276.
- BELITSER, N.V., ZAALISHVILI, G.V. & SYTNIANSKAJA, N.P. (1982). Ca^{2+} -binding sites and Ca^{2+} -ATPase activity in barley root tip cells. *Protoplasma* 111, 63-78.
- BELL, R.M. & COLEMAN, R.A. (1980). Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 459-487.
- BENNETT, A.B. & SPANSWICK, R.M. (1983). Optical measurements of ΔpH and $\Delta\psi$ in corn root membrane vesicles: Kinetic analysis of Cl^- effects on a proton-translocating ATPase. *J. Membr. Biol.* 71, 95-107.
- BENNETT, V. & CUATRECASAS, P. (1973). Preparation of inverted plasma membrane vesicles from isolated adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 311, 362-380.
- BENTRUP, F.W., PFRONER, H. & WAGNER, G. (1973). Evidence for differential action of indoleacetic acid upon ion fluxes in single cells of *Petroselinum sativum*. *Planta* 110, 369-372.
- BÜTTGER, M., ENGVILD, K.C. & SOLL, H. (1978). Growth of *Avena* coleoptiles and pH drop of protoplast suspensions induced by chlorinated indoleacetic acids. *Planta* 140, 89-92.

- BOROCHOV, A. & BOROCHOV, H. (1979). Increase in membrane fluidity in liposomes and plant protoplasts upon osmotic swelling. *Biochim. Biophys. Acta* 550, 546-549.
- BOROCHOV, A., HALEVY, A.H. & SHINITZKY, M. (1976). Increase in microviscosity with ageing in protoplast plasmalemma of rose petals. *Nature* 263, 158-159.
- BOSS, W.F. & MOTT, R.L. (1980). Effects of divalent cations and polyethylene glycol on the membrane fluidity of protoplasts. *Plant Physiol.* 66, 835-837.
- BOSS, W.F. & RUESINK, A.W. (1979). Isolation and characterization of concanavalin A-labeled plasma membranes of carrot protoplasts. *Plant Physiol.* 64, 1005-1011.
- BOWMAN, B.J., MAINZER, S.E., ALLEN, K.E. & SLAYMAN, C.W. (1978). Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial adenosine triphosphatases of *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 512, 13-38.
- BOYSEN-JENSEN, P. (1913). Über die Leitung des phototropischen Reizes in der Avenakoleoptile. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 31, 559-566.
- BOYSEN-JENSEN, P. (1928). Die phototropische Induktion in der Spitze der Avenakoleoptile. *Planta* 5, 464-477.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRISKIN, D.P. & LEONARD, R.T. (1982). Partial characterization of a phosphorylated intermediate associated with the plasma membrane ATPase of corn roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6922-6926.

- BRISKIN, D.P. & POOLE, R.J. (1983). Plasma membrane ATPase of red beet forms a phosphorylated intermediate.
Plant Physiol. 71, 507-512.
- BROWN, E.G. & NEWTON, R.P. (1981). Cyclic AMP and higher plants.
Phytochemistry 20, 2453-2463.
- BROWN, E.M., PAZOLES, C.J., CREUTZ, C.E., AURBACH, G.D. & POLLARD, H.B. (1978). Role of anions in parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 876-880.
- BUCKHOUT, T.J. YOUNG, K.A., LOW, P.S. & MORRÉ, D.J. (1981). *In vitro* promotion by auxins of divalent ion release from soybean membranes.
Plant Physiol. 68, 512-515.
- BUCKHOUT, T.J., MORRÉ, D.J., YOUNG, K.A. & LOW, P.S. (1980). Response of isolated plant membranes to auxins: calcium release.
Bot. Gaz. 141, 418-421.
- BUCKLEY, J.T. & HAWTHORNE, J.N (1972). Erythrocyte membrane polyphosphoinositide metabolism and the regulation of calcium binding.
J. Biol. Chem. 247, 7218-7223.
- CABANTCHIK, Z.I., KNAUF, P.A. & ROTHSTEIN, A. (1978). The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of 'probes'.
Biochim. Biophys. Acta 515, 239-302.
- CARONI, P. & CARAFOLI, E. (1981). Regulation of Ca^{2+} - pumping ATPase of heart sarcolemma by a phosphorylation-dephosphorylation process.
J. Biol. Chem. 256, 9371-9373.
- CARTY, S.E., JOHNSON, R.G. & SCARPA, A. (1981). Serotonin transport in isolated platelets granules. Coupling to the electrochemical proton gradient.
J. Biol. Chem. 256, 11244-11250.

- CARTY, S.E., JOHNSON, R.G. & SCARPA, A. (1982). Electrochemical proton gradient in dense granules isolated from anterior pituitary. *J. Biol. Chem.* 257, 7269-7273.
- CASEY, R.P., NJUS, D., RADDA, G.K. & SEHR, P.A. (1976). Adenosine triphosphate-evoked catecholamine release in chromaffin granules. Osmotic lysis as a consequence of proton translocation. *Biochem. J.* 158, 583-588.
- CHAPMAN, D. & GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. (1982). The interaction of intrinsic proteins and lipids in biomembranes. *Trends Biochem. Sci.* 7, 67-70.
- CHAZOTTE, B., VANDERKOOI, G. & CHIGNELL, D. (1982). Further studies on F_1 -ATPase inhibition by local anesthetics. *Biochim. Biophys. Acta* 680, 310-316.
- CIDON, S. & NELSON, N. (1983). A novel ATPase in the chromaffin granule membrane. *J. Biol. Chem.* 258, 2892-2898.
- CLARKSON, D.T. & HANSON, J.B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 239-298.
- CLELAND, R.E. (1971). Cell wall extension. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22, 197-222.
- CLELAND, R.E. (1976). Rapid stimulation of $K^+ - H^+$ exchange by a plant growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 333-338.
- CLELAND, R.E. (1980). Auxin and H^+ -excretion: the state of our knowledge. In: SKOOG, F. (Ed.). *Plant Growth Substances* 1979. pp 71-78. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- CLELAND, R.E. (1983). The mechanism of auxin-induced proton efflux. In: WAREING, P. (Ed.). *Plant Growth Substances* 1982. pp 23-31. Academic Press, New York.

- CLELAND, R.E. & RAYLE, D.L. (1978). Auxin, H^+ -excretion and cell elongation.
Bot. Mag. Tokyo Special Issue 1, 125-139.
- COCUCCI, M., BALLARIN-DENTI, A. & MARRÈ, M.T. (1980). Effects of orthovanadate on H^+ secretion, K^+ uptake, electrical potential difference and membrane ATPase activities of higher plant tissues.
Plant Sci. Lett. 17, 391-400.
- COHEN, F.S., AKABAS, M.H. & FINKELSTEIN, A. (1982). Osmotic swelling of phospholipid vesicles causes them to fuse with a planar phospholipid bilayer membrane.
Science 217, 458-460.
- COHEN, P. (1982). The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity.
Nature 296, 613-620.
- CONRAD, M.J. & SINGER, S.J. (1979). Evidence for a large internal pressure in biological membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5202-5206.
- CONRAD, M.J. & SINGER, S.J. (1981). The solubility of amphipathic molecules in biological membranes and lipid bilayers and its implications for membrane structure.
Biochemistry 20, 808-818.
- CONRAD, P.A., BINARI, L.L.W. & RACUSEN, R.H. (1982). Rapidly-secreting, cultured oat cells serve as a model system for the study of cellular exocytosis. Characterization of cells and isolated secretory vesicles.
Protoplasma 112, 196-204.
- CRAVEN, G.H., MOTT, R.L. & STEWARD, F.C. (1972). Solute accumulation in plant cells. IV. Effects of ammonium ions on growth and solute content.
Ann. Bot. 36, 897-914.

- CROSS, J.W. & BRIGGS, W.R. (1978). Properties of a solubilized microsomal auxin-binding protein from coleoptiles and primary leaves of *Zea mays*.
Plant Physiol. 62, 152-157.
- CROSS, J.W. & BRIGGS, W.R. (1979). Solubilized auxin-binding protein. Subcellular localization and regulation by a soluble factor from homogenates of corn shoots.
Planta 146, 263-270.
- CROSS, J.W., BRIGGS, W.R., DOHRMANN, U.C. & RAY, P.M. (1978). Auxin receptors of maize coleoptile membranes do not have ATPase activity.
Plant Physiol. 61, 581-584.
- CUATRECASAS, P. (1974). Membrane receptors.
Ann. Rev. Biochem. 43, 169-214.
- CUATRECASAS, P. & HOLLENBERG, M.D. (1976). Membrane receptors and hormone action.
Adv. Prot. Chem. 30, 251-451.
- CULLIS, P.R. & DE KRUIJFF, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes.
Biochim. Biophys. Acta 559, 399-420.
- CULLIS, P.R., DE KRUIJFF, B., HOPE, M.J., NAYAR, R. & SCHMID, S.L. (1980). Phospholipids and membrane transport.
Can. J. Biochem. 58, 1091-1100.
- CURRAN, M. & SEEMAN, P. (1977). Alcohol tolerance in a cholinergic nerve terminal: Relation to the membrane expansion-fluidization theory of ethanol action.
Science 197, 910-911.
- DAME, J.B. & SCARBOROUGH, G.A. (1981). Identification of the phosphorylated intermediate of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase as β -aspartyl phosphate.
J. Biol. Chem. 256, 10724-10730.
- DARWIN, C. (1880). The Power of Movements in Plants.
Murray, London.
- D'AUZAC, J. (1977). ATPase membranaire de vacuoles lysosomales: les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*.
Phytochemistry 16, 1881-1885.

- DAWSON, A.P., FARROW, B.G. & SELWYN, M.J. (1982). Studies on the nature of the high-affinity trialkyltin binding site of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 202, 163-169.
- DAWSON, A.P. & SELWYN, M.J. (1975). The action of tributyltin on energy coupling in coupling-factor-deficient submitochondrial particles. *Biochem. J.* 152, 333-339.
- DEKOWSKI, S.A., RYBICKI, A. & DRICKAMER, K. (1983). A tyrosine kinase associated with the red cell membrane phosphorylates band 3. *J. Biol. Chem.* 258, 2750-2753.
- DELHEZ, J., DUFOUR, J.P., THINES, D. & GOFFEAU, A. (1977). Comparison of the properties of plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPases in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* 79, 319-328.
- DEMAILLE, J.G., PETERS, K.A. & FISCHER, E.H. (1977). Isolation and properties of the rabbit skeletal muscle protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases. *Biochemistry* 16, 3080-3086.
- DIETER, P. & MARMÉ, D. (1980). Calmodulin activation of plant microsomal Ca^{2+} uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7311-7314.
- DIETER, P. & MARMÉ, D. (1981). Calmodulin-dependent, microsomal ATPase from corn (*Zea mays* L.) *FEBS Lett.* 125, 245-248.
- DODDS, J.H. & HALL, M.A. (1980). Plant hormone receptors. *Sci. Prog., Oxf.* 66, 513-535.
- DOHRMANN, U., HERTEL, R. & KOWALIK, H. (1978). Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta* 140, 97-106.

- DOLL, S. & HAUER, R. (1981). Determination of the membrane potential of vacuoles isolated from red-beet storage tissue. Evidence for an electrogenic ATPase. *Planta* 152, 153-158.
- DUNN, S.D. & HEPPEL, L.A. (1981). Properties and functions of the subunits of the *Escherichia coli* coupling factor ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 421-436.
- DU PONT, F.M., BENNETT, A.B. & SPANSWICK, R.M. (1982 a). Localization of a proton-translocating ATPase on sucrose gradients. *Plant Physiol.* 70, 1115-1119.
- DU PONT, F.M., GIORGI, D.L. & SPANSWICK, R.M. (1982 b). Characterization of a proton-translocating ATPase in microsomal vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* 70, 1694-1699.
- EBEL, R.E. & LARDY, H.A. (1975). Stimulation of rat liver mitochondrial adenosin triphosphatase by anions. *J. Biol. Chem.* 250, 191-196.
- EDWARDS, K.L. & GOLDSMITH, M.H.M. (1980). pH-dependent accumulation of indoleacetic acid by corn coleoptile sections. *Planta* 147, 457-466.
- EIBL, H. & LANDS, W.E.M. (1969). A new, sensitive determination of phosphate. *Anal. Biochem.* 30, 51-57.
- EPSTEIN, W. & LAIMINS, L.A. (1980). Potassium transport in *Escherichia coli*: diverse systems with common control by osmotic forces. *Trends Biochem. Sci.* 5, 21-23.
- ERDEI, L., TÓTH, I. & ZSOLDOS, F. (1979). Hormonal regulation of Ca^{2+} -stimulated K^{+} influx and Ca^{2+} , K^{+} -ATPase in rice roots: *in vivo* and *in vitro* effects of auxin and reconstitution of the ATPase. *Physiol. Plant.* 45, 448-452.

- EVERETT, N.P., WANG, T.L., GOULD, A.R. & STREET, H.E. (1981). Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells II. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Protoplasma 106, 15-22.
- FARQUHAR, M.G. & PALADE, G.E. (1981). The Golgi Apparatus (Complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. J. Cell Biol. 91, 77S-103S.
- FARRIMOND, J.A., ELLIOTT, M.C. & CLACK, D.W. (1981). Auxin structure/activity relationships: aryloxyacetic acids. Phytochemistry 20, 1185-1190.
- FELLE, H. (1982). Current-voltage analysis of the fusiococcin effect on the plasmalemma of root hair cells of *Sinapis alba*. In: MARMÉ, D., MARRÉ, E. & HERTEL, R. (Eds.) Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell. pp 61-68. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- FILLINGAME, R.H. (1980). The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 49, 1079-1113.
- FIRN, R.D. & KEARNS, A.W. (1983). The search for the auxin receptor. In: WAREING, P. (Ed.). Plant Growth Substances 1982. pp 385-393. Academic Press, New York.
- FISHER, M.L. & ALBERSHEIM, P. (1974). Characterization of a H^+ -efflux from suspension-cultured plant cells. Plant Physiol. 53, 464-468.
- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. (1979). Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $Ca^{2+}/2 H^+$ antiport. J. Biol. Chem. 254, 6236-6239.
- FUKUMOTO, M. & NAGAI, K. (1982). Effects of calmodulin antagonists on the mitochondrial and microsomal Ca^{2+} uptake in apple fruit. Plant Cell Physiol. 23, 1435-1441.

- GAUTHERET, R.J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. C.r.hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 208, 118-121.
- GAUTHERET, R.J. (1959). La culture des tissus végétaux. Masson et Cie., Paris.
- GLIEMANN, J., ØSTERLIND, K., VINTEN, J. & GAMMELTOFT, S.. (1972). A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat cells. Biochim. Biophys. Acta 286, 1-9.
- GLYNN, I.M (1964). The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol. Rev. 16, 381-407.
- GLYNN, I.M. & KARLISH, S.J.D. (1975). The sodium pump. Ann.Rev. Physiol. 37, 13-55.
- GOFFEAU, A. & SLAYMAN, C.W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 639, 197-223.
- GOLDSMITH, M.H.M. (1982). A saturable site responsible for polar transport of indole-3-acetic acid in sections of maize coleoptiles. Planta 155, 68-75.
- GOLDSMITH, M.H.M. & RAY, P.M. (1973). Intracellular localization of the active process in polar transport of auxin. Planta 111, 297-314.
- GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Ann. Rev. Biochem. 46, 897-930.
- GOULD, J.M (1976). Inhibition by triphenyltin chloride of a tightly-bound membrane component involved in photophosphorylation. Eur. J. Biochem. 62, 567-575.
- GRAZIANA, A., RANJEVA, R. & BOUDET, A.M. (1983). Provoked changes in cellular calcium controlled protein phosphorylation and activity of quinate: NAD⁺ oxidoreductase in carrot cells. FEBS Lett. 156, 325-328.

- GRESSER, M.J. (1983). Regulation of enzyme activity by cyclic phosphorylation-dephosphorylation cascades. Thermodynamic constraints. *Biochim. Biophys. Acta* 743, 316-322.
- GRIFFING, L.R. & RAY, P.M. (1979). Dependence of cell wall secretion on calcium. *Plant Physiol.* 63, Suppl. 51.
- GROSS, J. & MARMÉ, D. (1978). ATP-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1232-1236.
- GUPTA, M.N. & WOLD, F. (1980). A convenient spectrophotometric assay for phospholipase D using p-nitrophenyl-phosphocholine as substrate. *Lipids* 15, 594-596.
- HAGER, A., FRENZEL, R. & LAIBLE, D. (1980). ATP-dependent proton transport into vesicles of microsomal membranes of *Zea mays* coleoptiles. *Z. Naturforsch.* 35 c, 783-793.
- HAGER, A. & HELMLE, M. (1981). Properties of an ATP-fueled, Cl^- -dependent proton pump localized in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles. *Z. Naturforsch.* 36 c, 997-1008.
- HAGER, A. & HERMSDORF, P. (1981). A $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$ antiporter in membranes of microsomal vesicles from maize coleoptiles, a secondary energized Ca^{2+} pump. *Z. Naturforsch.* 36 c, 1009-1012.
- HAGER, A., MENZEL, H. & KRAUSS, A. (1971). Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* 100, 47-75.
- HANAHAN, D.J. & CHAIKOFF, I.L. (1947). The phosphorus-containing lipides of the carrot. *J. Biol. Chem.* 168, 233-240.
- HARWOOD, J.L. (1980). Plant acyl lipids: structure, distribution, and analysis. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. (Eds.) *The Biochemistry of Plants. Vol. IV.* STUMPF, P.K. (Ed.) *Lipids: Structure and Function.* pp 1-55. Academic Press, New York.

- HASCHKE, H.-P. & LÖTTGE, U. (1973). β -Indolyllessigsäure (-IES)-abhängiger $K^+ - H^+$ -Austauschmechanismus und Streckungswachstum bei *Avena*-Koleoptilen. Z. Naturforsch. 28 c, 555-558.
- HASCHKE, H.-P. & LÖTTGE, U. (1975). Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin-dependent $K^+ - H^+$ exchange and growth in *Avena* coleoptile segments. Plant Physiol. 56, 696-698.
- HASCHKE, H.-P. & LÖTTGE, U. (1977). Action of auxin on dark CO_2 fixation in *Avena* coleoptile segments as related to elongation growth. Plant Sci. Lett. 8, 53-58.
- HAUSER, H., CHAPMAN, D. & DAWSON, R.M.C. (1969). Physical studies of phospholipids. XI. Ca^{2+} binding to monolayers of phosphatidylserine and phosphatidylinositol. Biochim. Biophys. Acta 183, 320-333.
- HAUSER, H., FINER, E.G. & DARKE, A. (1977). Crystalline anhydrous Ca-phosphatidylserine bilayers. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 267-274.
- HAUSER, H. & PHILLIPS, M.C. (1979). Interactions of the polar groups of phospholipid bilayer membranes. Progr. Surface Membrane Sci. 13, 297-413.
- HELLER, M. (1978). Phospholipase D. Adv. Lipid Res. 16, 267-326.
- HELLER, M., MOZES, N., ABRAMOVITZ-PERI, I. & MAES, E. (1974). Phospholipase D from peanut seeds. IV. Final purification and some properties of the enzyme. Biochim. Biophys. Acta 369, 397-410.
- HEPLER, P.K. (1980). Membranes in the mitotic apparatus of barley cells. J. Cell Biol. 86, 490-499.
- HERMAN, E.M. & CHRISPEELS, M.J. (1980). Characteristics and subcellular localization of phospholipase D and phosphatidic acid phosphatase in mung bean cotyledons. Plant Physiol. 66, 1001-1007.

- HERTEL, R. (1981). Zur Auxinproblematik: Primäre Wirkung, Transport und *in vitro*-Bindung. Biochem. Physiol. Pflanzen 176, 495-506.
- HERTEL, R., EVANS, M.L., LEOPOLD, A.C. & SELL, H.M. (1969). The specificity of the auxin transport system. Planta 85, 238-249.
- HERTEL, R. & FLORY, R. (1968). Auxin movement in corn coleoptiles. Planta 82, 123-144.
- HERTEL, R. & LEOPOLD, A.C. (1963). Versuche zur Analyse des Auxintransports in der Koleoptile von *Zea mays* L. . Planta 59, 535-562.
- HERTEL, R., LOMAX, T.L. & BRIGGS, W.R. (1983). Auxin transport in membrane vesicles from *Cucurbita pepo* L. Planta 157, 193-201.
- HERTEL, R., THOMSON, K.-S. & RUSSO, V.E.A. (1972). *In vitro* auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. Planta 107, 325-340.
- HETHERINGTON, A. & TREWAVAS, A. (1982). Calcium-dependent protein kinase in pea shoot membranes. FEBS Lett. 145, 67-71.
- HOBBS, A.S. & ALBERS, R.W. (1980). The structure of proteins involved in active membrane transport. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 259-291.
- HODGES, T.K. & LEONARD, R.T. (1974). Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (Eds.). Methods in Enzymology. Vol. XXXII. FLEISCHER, S. & PACKER, L. (Eds.) Biomembranes Part B. pp 392-406. Academic Press, New York, San Francisco, London.

- HOFMANN, S.L. & MAJERUS, P.W. (1982). Modulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity by phospholipid interactions, diglycerides and calcium ions.
J. Biol. Chem. 257, 14359-14364.
- HUI, F.K. & BARTON, P.G. (1973). Mesomorphic behaviour of some phospholipids with aliphatic alcohols and other non-ionic substances.
Biochim. Biophys. Acta 296, 510-517.
- HUTTON, J.C. (1982). The internal pH and membrane potential of the insulin-secretory granule.
Biochem. J. 204, 171-178.
- HUTTON, J.C. & PESHAVARIA, M. (1982). Proton-translocating Mg^{2+} -dependent ATPase activity in insulin-secretory granules.
Biochem. J. 204, 161-170.
- IKEMOTO, N. (1982). Structure and function of the calcium pump protein of sarcoplasmic reticulum.
Ann. Rev. Physiol. 44, 297-317.
- IMAI, A., ISHIZUKA, Y., KOWAI, K. & NOZAWA, Y. (1982). Evidence for coupling of phosphatidic acid formation and calcium influx in thrombin-activated human platelets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 752-759.
- IRVINE, R.F., LETCHER, A.J. & DAWSON, R.M.C. (1980). Phosphatidylinositol phosphodiesterase in higher plants.
Biochem. J. 192, 279-283.
- JABLANOVIĆ, M. & NOODÉN, L.D. (1974). Changes in competitive IAA binding in relation to bud development in pea seedlings.
Plant Cell Physiol. 15, 687-692.
- JACOBS, M. & GILBERT, S.F. (1983). Basal localization of the presumptive auxin transport carrier in pea stem cells.
Science 220, 1297-1300.
- JACOBS, M. & HERTEL, R. (1978). Auxin binding to sub-cellular fractions from hypocotyls: *in vitro* evidence for an auxin transport carrier.
Planta 142, 1-10.

- JACOBS, M. & TAIZ, L. (1980). Vanadate inhibition of auxin-enhanced H^+ secretion and elongation in pea epicotyls and oat coleoptiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7242-7246.
- JACOBSON, K. & PAPAHAJIOPOULOS, D. (1975). Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH and concentration of bivalent cations. *Biochemistry* 14, 152-161.
- JOHNSON, R.G., BEERS, M.F. & SCARPA, A. (1982). H^+ ATPase of chromaffin granules. Kinetics, regulation, and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 257, 10701-10707.
- KAHN, C.R. (1976). Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *J. Cell Biol.* 70, 261-286.
- KAKINUMA, Y., OHSUMI, Y. & ANRAKU, Y. (1981). Properties of H^+ -translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256, 10859-10863.
- KARLSON, P. (1982). Was sind Hormone? Der Hormonbegriff in Geschichte und Gegenwart. *Naturwissensch.* 69, 3-14.
- KASAI, M. & KOMETANI, T. (1979). Inhibition of anion permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles by 4-acetamido-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-disulfonate. *Biochim. Biophys. Acta* 557, 243-247.
- KASAMO, K. & YAMAKI, T. (1974). Effect of auxin on Mg^{2+} -activated and -inhibited ATPases from mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 15, 965-970.
- KATEKAR, G.F. (1979). Auxins: On the nature of the receptor site and molecular requirements for auxin activity. *Phytochemistry* 18, 223-233.
- KATOH, N. & KUO, J.F. (1982). Subcellular distribution of phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase in guinea pig heart, spleen, and cerebral cortex, and inhibition of the enzyme by TRI-TON-X-100. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 590-595.

- KEIFER, D.W., FRANCESCHI, V.R. & LUCAS, W.J. (1982). Plasmalemma chloride transport in *Chara corallina*. Inhibition by 4',4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic acid stilbene.
Plant Physiol. 70, 1327-1334.
- KEIFER, D.W. & SPANSWICK, R. (1978). Activity of the electrogenic pump in *Chara corallina* as inferred from measurements of the membrane potential, conductance, and potassium permeability.
Plant Physiol. 62, 653-661.
- KENDE, H. & GARDNER, G. (1976). Hormone binding in plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 267-290.
- KENNEDY, C.D. & HARVEY, J.M. (1972). Plant growth substance action on lecithin and lecithin/cholesterol vesicles.
Pestic. Sci. 3, 715-727.
- KHATRA, B.S. & SODERLING, T.R. (1978). Reversible inhibition of skeletal muscle phosphoprotein phosphatase by ATP, phosphate and fluoride.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 647-654.
- KIKKAWA, U., TAKAI, Y., MINAKUCHI, R., INOHARA, S. & NISHIZUKA, Y. (1982). Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification and properties.
J. Biol. Chem. 257, 13341-13348.
- KISHIMOTO, A., TAKAI, Y., MORI, T., KIKKAWA, U. & NISHIZUKA, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover.
J. Biol. Chem. 255, 2273-2276.
- KLEE, C.B., CROUCH, T.H. & RICHMAN, P.G. (1980). Calmodulin.
Ann. Rev. Biochem. 49, 489-515.
- KLEINER, D. (1981). The transport of NH_2 and NH_4^+ across biological membranes.
Biochim. Biophys. Acta 639, 41-52.

- KLEINIG, H. & KOPP, C. (1978). Lipids, lipid turnover, and phospholipase D in plant suspension culture cells (*Daucus carota*). *Planta* 139, 61-65.
- KREBS, E.G. & BEAVO, J.A. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 923-959.
- KUO, J.F., ANDERSON, R.G.G., WISE, B.C., MACKERLOVA, L., SALOMONSSON, I., BRACKETT, N.L., KATOH, N., SHOJI, M. & WRENN, R.W. (1980). Calcium-dependent protein kinase: Widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7039-7043.
- KURIOKA, S. & MATSUDA, M. (1976). Phospholipase C assay using p-nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Anal. Biochem.* 75, 281-289.
- KURKDJIAN, A., MATHIEU, Y. & GUERN, J. (1982). Evidence for an action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the vacuolar pH of *Acer pseudoplatanus* cells in suspension culture. *Plant Sci. Lett.* 27, 77-86.
- KYTE, J. (1975). Structural studies of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. The relationship between molecular structure and the mechanism of active transport. *J. Biol. Chem.* 250, 7443-7449.
- LAPETINA, E.G. & MICHELL, R.H. (1973). Phosphatidylinositol metabolism in cells receiving extracellular stimulation. *FEBS Lett.* 31, 1-10.
- LEAVER, C.J. & GRAY, M.W. (1982). Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 373-402.

- LEE, J.S., MULKEY, T.J. & EVANS, M.L. (1983). Reversible loss of gravitropic sensitivity in maize roots after tip application of calcium chelators. *Science* 220, 1375-1376.
- LEGGE, R.L., THOMPSON, J.E., BAKER, J.E. & LIEBERMAN, M. (1982). The effect of calcium on the fluidity and phase properties of microsomal membranes isolated from postclimacteric Golden Delicious apples. *Plant Cell Physiol.* 23, 161-169.
- LELKES, P.I., BACH, D. & MILLER, I.R. (1980). Interactions of auxin (IAA) with lipid membranes. In: SPANSWICK, R.M., LUCAS, W.J. & DAINTY, J. (Eds.). *Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues*. pp 539-540. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- LEMBI, C.A., MORRÉ, D.J., THOMSON, K.S. & HERTEL, R. (1971). N-1-Naphthylphthalamic-acid-binding activity of a plasma membrane-rich fraction from maize coleoptiles. *Planta* 99, 37-45.
- LENAZ, G., BERTOLI, E., CURATOLA, G., MAZZANTI, L. & BIGI, A. (1976). Lipid protein interaction in mitochondria. Spin and fluorescence probe studies on the effect of n-alkanols on phospholipid vesicles and mitochondrial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 278-288.
- LEVIN, R.M. & WEISS, B. (1977). Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol. Pharmacol.* 13, 690-697.
- LEVIN, R.M. & WEISS, B. (1979). Selective binding of anti-psychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 454-459.

- LIBBENGA, K.R., MAAN, A.C. & BOGERS, R.J. (1982). Auxin binding sites from tobacco cell and tissue cultures. In: MARRE, D., MARRE, E. & HERTEL, R. (Eds.). *Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell*. pp 285-292. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- LIN, P.P.-C., MORI, T. & KEY, J.L. (1980). Phosphoprotein phosphatase of soybean hypocotyls. Purification, properties and substrate specificities. *Plant Physiol.* 66, 368-374.
- LIN, W. (1981). Inhibition of anion transport in corn root protoplasts. *Plant Physiol.* 68, 435-438.
- LINDBERG, S. (1982). Sucrose and ouabain effects on the kinetic properties of a membrane-bound ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$) ATPase in sugar beet roots. *Physiol. Plant.* 54, 455-460.
- LLOYD, C.W., LOWE, S.B. & PEACE, G.W. (1980). The mode of action of 2,4-D in counteracting the elongation of carrot cells grown in culture. *J. Cell Sci.* 45, 257-268.
- LOPEZ, V., STEVENS, T. & LINDQUIST, R.N. (1976). Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 31-38.
- LORD, J.M., KAGAWA, T., MOORE, T.S. & BEEVERS, H. (1973). Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* 57, 659-667.
- LORENSEN, M.Y., LEE, Y.-C. & JACOBS, L.S. (1981). Identification and characterization of an anion-sensitive Mg^{2+} -ATPase in pituitary secretory granule membranes. *J. Biol. Chem.* 256, 12802-12810.

- LYMAN, G.H., PAPAHAADJOPOULOS, D. & PREISLER, H.D. (1976). Phospholipid membrane stabilization by dimethylsulfoxide and other inducers of friend leukemic cell differentiation. Biochim. Biophys. Acta 448, 460-473.
- MAAN, A.C., VREUGDENHIL, D., BOGERS, R.J. & LIBBENGA, K.R. (1983). The complex kinetics of auxin-binding to a particulate fraction from tobacco-pith callus. Planta 158, 10-15.
- MACARA, I.G. (1980). Vanadium - an element in search of a role. Trends Biochem. Sci. 5, 92-94.
- MACKENZIE, III C.W., BULBULIAN, G.J. & BISHOP, J.S. (1980). Use of fluoride to inactivate phosphorylase a phosphatases from rat liver cytosol. Presence of fluoride-insensitive glycogen synthase-specific phosphatase. Biochim. Biophys. Acta 614, 413-424.
- MANDALA, S., METTLER, I.J. & TAI, Z. L. (1982). Localization of the proton pump of corn coleoptile microsomal membranes by density gradient centrifugation. Plant Physiol. 70, 1743-1747.
- MARIN, B. & BLASCO, F. (1982). Further evidence for the proton pumping work of tonoplast ATPase from *Hevea latex vacuome*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 354-361.
- MARMÉ, D. (1983). The role of Ca^{2+} in signal transduction of higher plants. In: WAREING, P. (Ed.). Plant Growth Substances 1982. pp 419-426. Academic Press, New York.
- MARTY, F. (1978). Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 852-856.
- MARTY, F., BRANTON, D. & LEIGH, R.A. (1980). Plant vacuoles. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. (Eds.). The Biochemistry of Plants. Vol. I. TOLBERT, N.E. (Ed.) The Plant Cell. pp 625-658. Academic Press, New York.

- MASUDA, Y. (1978). Auxin-induced cell wall loosening. Bot Mag. Tokyo Special Issue 1, 103-123.
- MATSUZAWA, Y. & HOSTETLER, K.Y. (1980). Properties of phospholipase C isolated from rat liver lysosomes. J. Biol. Chem. 255, 646-652.
- MAZZAI, G.J., KATOH, N. & KUO, J.F. (1982). Polymyxin B is a more selective inhibitor for phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase than for calmodulin-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 1129-1133.
- MC DONOUGH, J.P. & MAHLER, H.P. (1982). Covalent phosphorylation of the Mg^{2+} -dependent ATPase of yeast plasma membranes. J. Biol. Chem. 257, 14579-14581.
- MEANS, A.R. & DEDMAN, J.R. (1980). Calmodulin - an intracellular calcium receptor. Nature 285, 73-77.
- METTLER, I.J., MANDALA, S. & TAI, L. (1982). Characterization of *in vitro* proton pumping by microsomal vesicles isolated from corn coleoptiles. Plant Physiol. 70, 1738-1742.
- MICHELL, R.H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. Biochim Biophys. Acta 415, 81-147.
- MICHELL, R.H. (1982). Is phosphatidylinositol really out of the calcium gate? Nature 296, 492-493.
- MILLER, C. & WHITE, M.M. (1980). A voltage-gated Cl^- conductance channel from *Torpedo* electroplax membrane. Ann. N.Y. Acad. Sci. 341, 534-551.
- MITCHELL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148.

- MITCHELL, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.
Biol. Rev. 41, 445-502.
- MOLLENHAUER, H.H. & MORRÉ, D.J. (1980). The Golgi Apparatus.
In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. (Eds.)
The Biochemistry of Plants. Vol. I.
TOLBERT, N.E. (Ed.). The Plant Cell.
pp 437-488. Academic Press, New York.
- MOORE, T.S. (1982). Phospholipid biosynthesis.
Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 235-259.
- MOORE, T.S., LORD, J.M., KAGAWA, T. & BEEVERS, H. (1973).
Enzymes of phospholipid metabolism
in the endoplasmic reticulum of
castor bean endosperm.
Plant Physiol. 52, 50-53.
- MORRIS, M.R. & NORTHCOPE, D.H. (1977). Influence of cations
at the plasma membrane in controlling
polysaccharide secretion from sycamore suspension cells.
Biochem. J. 166, 603-618.
- MOTAIS, R., BAROIN, A., MOTAIS, A. & BALDY, S. (1980). Inhibition of anion and glucose permeabilities by anesthetics in erythrocytes. The mechanisms of action of positively and negatively charged drugs.
Biochim. Biophys. Acta 599, 673-688.
- MOULES, I.K., ROONEY, E.K. & LEE, A.G. (1982). Binding of amphipathic drugs and probes to biological membranes.
FEBS Lett. 138, 95-100.
- MUDD, J.B. (1980). Phospholipid biosynthesis. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. (Eds.). The Biochemistry of Plants. Vol. IV.
STUMPF, P.K. (Ed.). Lipids: Structure and Function. pp 249-282.
Academic Press, New York.
- MUDGE, K.W. (1980). Binding of auxin to membrane receptors for developing fruits.
Ph D thesis, Washington State University, Pullman.

- MUÑOZ, E. (1982). Polymorphism and conformational dynamics of F₁-ATPases from bacterial membranes. A model for the regulation of these enzymes on the basis of molecular plasticity. *Biochim. Biophys. Acta* 650, 233-265.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- MURPHY, G.J.P. (1979). Plant hormone receptors: Comparison of naphthaleacetic and binding by maize extracts and by a non-plant protein. *Plant Sci. Lett.* 15, 183-191.
- MURPHY, G.J.P. (1980). A reassessment of the binding of naphthaleneacetic acid by membrane preparations from maize. *Planta* 149, 417-426.
- MUTO, S. (1982). Distribution of calmodulin within wheat leaf cells. *FEBS Lett.* 147, 161-164.
- NANDINI-KISHORE, S.G., MATTOX, S.M., MARTIN, C.E. & THOMPSON, G.A.Jr. (1979). Membrane changes during growth of *Tetrahymena* in the presence of ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* 551, 315-327.
- NARAYANAN, K.R., MUDGE, K.W. & POOVAIAH, B.W. (1981 a). *In vitro* auxin binding to cellular membranes of cucumber fruits. *Plant Physiol.* 67, 836-840.
- NARAYANAN, K.R., MUDGE, K.W. & POOVAIAH, B.W. (1981 b). Demonstration of auxin binding to strawberry fruit membranes. *Plant Physiol.* 68, 1289-1293.
- NISHIZUKA, Y. (1983). Phospholipid degradation and signal translation for protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 8, 13-16.
- NJUS, D. & RADDA, G.K. (1978). Bioenergetic processes in chromaffin granules. A new perspective on some old problems. *Biochim. Biophys. Acta* 463, 219-244.

- NOVIKOFF, A.B. (1976). The endoplasmic reticulum: A cytochemist's view (A review).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73,
2781-2787.
- OHKUMA, S., MORIYAMA, Y. & TAKANO, T. (1982). Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79,
2758-2762.
- OHSUMI, Y. & ANRAKU, Y. (1983). Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem. 258, 5614-5617.
- OSBORNE, D.J. & MULLINS, M.G. (1969). Auxin, ethylene and kinetin in a carrier-protein model system for the polar transport of auxins in petiole segments of *Phaseolus vulgaris*.
New Phytol. 68, 977-991.
- OOSTROM, H., KULESCHA, Z., VAN VLIET, T.B. & LIBBENGA, K.R. (1980). Characterization of a cytoplasmic auxin receptor from tobacco-pith callus.
Planta 149, 44-47.
- OOSTROM, H., VAN LOOPIK-DETMER, M.A. & LIBBENGA, K.R. (1975). A high affinity receptor for indoleacetic acid in cultured tobacco pith explants.
FEBS Lett. 59, 194-197.
- OVCHINNIKOV, Y.A., ABDULAEV, N.G. & MODYANOV, N.N. (1982). Structural basis of proton-translocating protein function.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 11,
445-463.
- PAÁL, A. (1919). Über phototropische Reizleitung.
Jb. Wiss. Bot. 58, 406-458.
- PAIGEN, K. (1958). The properties of particulate phosphoprotein phosphatase.
J. Biol. Chem. 233, 388-394.

- PATERSON, S.J., BUTLER, K.W., HUANG, P., LABELLE, J., SMITH, I.C.P. & SCHNEIDER, H. (1972). The effects of alcohols on lipid bilayers: a spin label study. *Biochim. Biophys. Acta* 266, 597-602.
- PAZOLES, C.J., CREUTZ, C.E., RAMU, A. & POLLARD, H.B. (1980). Permeant anion activation of Mg-ATPase activity in chromaffin granules. Evidence for direct coupling of proton and anion transport. *J. Biol. Chem.* 255, 7863-7869.
- PAZOLES, C.J. & POLLARD, H.B. (1978). Evidence for stimulation of anion transport in ATP-evoked transmitter release from isolated secretory vesicles. *J. Biol. Chem.* 253, 3962-3969.
- PÉAUD-LENOËL, C. (1977). The hormonal regulation of the cell division cycle. In: PILET, P.E. (Ed.). *Plant Growth Regulation*. pp 240-248. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- PFRONER, H. & BENTRUP, F.-W. (1978). Fluxes and compartmentation of K^+ , Na^+ and Cl^- , and action of auxins in suspension-cultured *Petroselinum* cells. *Planta* 143, 213-223.
- PHILIPSON, K.D., BERS, D.M. & NISHIMOTO, A.Y. (1980). The role of phospholipids in the Ca^{2+} binding of isolated cardiac sarcolemma. *J. Mol. Cell Cardiol.* 12, 1159-1173.
- POLLARD, H.B., PAZOLES, C.J., CREUTZ, C.E. & ZINDER, O. (1979 a). The chromaffin granule and possible mechanisms of exocytosis. *Intern. Rev. Cytol.* 58, 159-197.
- POLLARD, H.B., SHINDO, H., CREUTZ, C.E., PAZOLES, C.J., COHEN, J.S. (1979 b). Internal pH and state of ATP in adrenergic chromaffin granules determined by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 254, 1170-1177.

- POLLARD, H.B., TACK-GOLDMAN, K., PAZOLES, C.J., CREUTZ, C.E. & SHULMAN, N.R. (1977). Evidence for control of serotonin secretion from human platelets by hydroxyl ion transport and osmotic lysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5295-5299.
- POLYA, G.M. & DAVIES, J.R. (1982). Resolution of Ca^{2+} - calmodulin-activated protein kinase from wheat germ.
FEBS Lett. 150, 167-171.
- POOLE, R.J. (1978). Energy coupling for membrane transport in plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 437-460.
- POOVAIAH, B.W. & LEOPOLD, A.C. (1976). Effects of inorganic solutes on the binding of auxin.
Plant Physiol. 58, 783-785.
- PRESSMAN, B.C. (1976). Biological applications of ionophores.
Ann. Rev. Biochem. 45, 501-530.
- PUTNEY, J.W.Jr., WEISS, S.J., VAN DE WALLE, C.M. & HADDAS, R.A. (1980). Is phosphatidic acid a calcium ionophor under neurohumoral control?
Nature 284, 345-347.
- QUAIL, P.H. (1979). Plant cell fractionation.
Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 425-484.
- RAO, K.P. & RANDALL, D.D. (1980). Plant pyruvate dehydrogenase complex: Inactivation and reactivation by phosphorylation and dephosphorylation.
Arch. Biochem. Biophys. 200, 461-466.
- RASI-CALDOGNO, F., DE MICHELIS, M.I. & PUGLIARELLO, M.C. (1982). Active transport of Ca^{2+} in membrane vesicles from pea. Evidence for a $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ antiport.
Biochim. Biophys. Acta 693, 287-295.

- RAVEN, J.A. (1975). Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol.* 74, 163-172.
- RAY, P.M. (1977). Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 59, 594-599.
- RAY, P.M., DOHRMANN, U. & HERTEL, R. (1977 a). Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue. *Plant Physiol.* 59, 357-364.
- RAY, P.M., DOHRMANN, U. & HERTEL, R. (1977 b). Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. *Plant Physiol.* 60, 585-591.
- REBECCHI, M.J., KOLESNICK, R.N. & GERSHENGORN, M.C. (1983). Thyrotropin-releasing hormone stimulates rapid loss of phosphatidylinositol and its conversion to 1,2-diacylglycerol and phosphatidic acid in rat mammotropic pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 258, 227-234.
- REFENO, G., RANJEVA, R. & BOUDET, A.M. (1982). Modulation of quinate: NAD⁺ oxidoreductase activity through reversible phosphorylation in carrot cell suspension. *Planta* 154, 193-198.
- REINERT, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53, 318-333.
- REINERT, J., BACKS, D. & KROSING, M. (1966). Faktoren der Embryogenese in Gewebekulturen aus Kulturformen von Umbelliferen. *Planta* 68, 375-378.

- ROUGHAN, P.G. & SLACK, C.R. (1976). Is phospholipase D really an enzyme? A comparison of *in situ* and *in vitro* activities. Biochim. Biophys. Acta 431, 86-95.
- RUBEN, L. & RASMUSSEN, H. (1981). Phenothiazines and related compounds disrupt mitochondrial energy production by a calmodulin-independent reaction. Biochim. Biophys. Acta 637, 415-422.
- RUBERY, P.H. (1977). The specificity of carrier-mediated auxin uptake by suspension-cultured crown gall cells. Planta 135, 275-283.
- RUBERY, P.H. (1978). Hydrogen ion dependence of carrier-mediated auxin uptake by suspension-cultured crown gall cells. Planta 142, 203-206.
- RUBERY, P.H. (1981). Auxin receptors. Ann.Rev. Plant Physiol. 32, 569-596.
- RUBERY, P.H. & SHELDRAKE, A.R. (1974). Carrier-mediated auxin transport. Planta 118, 101-121.
- SANDERMANN, H. Jr. (1978). Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim. Biophys. Acta 515, 209-237.
- SARKADI, B. (1980). Active calcium transport in human red cells. Biochim. Biophys. Acta 604, 159-190.
- SCALLA, R., AMORY, A., RIGAUD, J. & GOFFEAU, A. (1983). Phosphorylated intermediate of a transport ATPase and activity of protein kinase in membranes from corn roots. Eur. J. Biochem. 132, 525-530.
- SCATCHARD, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672.

- SCHATZMAN, R.C., WISE, B.C. & KUO, J.F. (1981). Phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase: inhibition by antipsychotic drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 669-676.
- SCHERER, G.F.E. (1981). Auxin-stimulated ATPase in membrane fractions from pumpkin hypocotyls (*Cucurbita maxima* L). *Planta* 151, 434-438.
- SCHERER, G.F.E. & MORRÉ, D.J. (1978). *In vitro* stimulation by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid of an ATPase and inhibition of phosphatidate phosphatase of plant membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 238-247.
- SCHNEIDER, D.L. (1981). ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. *J. Biol. Chem.* 256, 3858-3864.
- SCHULMAN, H. & GREENGARD, P. (1978). Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5432-5436.
- SELWYN, M.J., DAWSON, A.P., STOCKDALE, M. & GAINS, N. (1970). Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl- and triphenyltin compounds. *Eur. J. Biochem.* 14, 120-126.
- SEMBDNER, G., GROSS, D., LIEBISCH, H.-W. & SCHNEIDER, G. (1980). Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In: PIRSON, A. & ZIMMERMANN, M.H. (Eds.). *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series. Vol. IX. MAC MILLAN, J. (Ed.). *Hormonal Regulation of Development I. Molecular Aspects of Plant Hormones*. pp 281-444. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- SENIOR, A.E. (1979). The mitochondrial ATPase. In: CAPALDI, R.A. (Ed.). Membrane Proteins in Energy Transduction. pp 233-278. Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
- SERHAN, C. ANDERSON, P., GOODMAN, E., DUNHAM, P. & WEISSMANN, G. (1981). Phosphatidate and oxidized fatty acids are calcium ionophores. Studies employing Arsenazo III in liposomes. J. Biol. Chem. 256, 2736-2741.
- SERHAN, C.N., FRIDOVICH, J., GOETZL, E.J., DUNHAM, P.B. & WEISSMANN, G. (1982). Leukotriene B₄ and phosphatidic acid are calcium ionophores. Studies employing Arsenazo III in liposomes. J. Biol. Chem. 257, 4746-4752.
- SHACTER-NOIMAN, E. & CHOCK, P.B. (1983). Properties of a M_r = 38,000 phosphoprotein phosphatase. Modulation by divalent cations, ATP, and fluoride. J. Biol. Chem. 258, 4214-4219.
- SHAVIT, N. (1980). Energy transduction in chloroplasts: Structure and function of the ATPase complex. Ann. Rev. Biochem. 49, 111-138.
- SHINITZKI, M. & HENKART, P. (1979). Fluidity of cell membranes - current concepts and trends. Intern. Rev. Cytol. 60, 121-147.
- SHINITZKY, M. & INBAR, M. (1976). Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. Biochim. Biophys. Acta 433, 133-149.
- SHUKLA, S.D. (1982). Phosphatidylinositol specific phospholipases C. Life Sci. 30, 1323-1335.
- SILVERSTEIN, S.C., STEINMAN, R.M. & COHN, Z.A. (1977). Endocytosis. Ann. Rev. Biochem. 46, 669-722.
- SINGER, S.J. & NICOLSON, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720-731.

- SLOCUM, R.D. & ROUX, S.J. (1983). Cellular and subcellular localization of calcium in gravi-stimulated oat coleoptiles and its possible significance in the establishment of tropic curvature. *Planta* 157, 481-492.
- SÜDING, H. (1925). Zur Kenntnis der Wuchshormone in der Haferkoleoptile. *Jb. Wiss. Bot.* 64, 587-603.
- SOMERMEYER, M.G., KNAUSS, T.C., WEINBERG, J.M. & HUMES, H.D. (1983). Characterization of Ca^{2+} transport in rat renal brush-border membranes and its modulation by phosphatidic acid. *Biochem. J.* 214, 37-46.
- SPECTOR, M., O'NEAL, S. & RACKER, E. (1980). Phosphorylation of the β -subunit of Na^{+} K^{+} -ATPase in *Ehrlich ascites* tumor by a membrane-bound protein kinase. *J. Biol. Chem.* 255, 8370-8373.
- SPLITZER, E. BÜHMER, F.D. & GROSSE, R. (1983). Identification of Ca^{2+} -pump-related phosphoprotein in plasma membrane vesicles of *Ehrlich Ascites* carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 728, 50-58.
- SRIVASTAVA, P.N., BREWER, J.M. & WHITE, R.A. (1982). Hydrolysis of p-nitrophenylphosphorylcholine by alkaline phosphatase and phospholipase C from rabbit sperm-acrosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1120-1125.
- STEWART, A.A., INGEBRITSEN, T.S., MANALAN, A., KLEE, C.B. & COHEN, P. (1982). Discovery of a Ca^{2+} - and calmodulin-dependent protein phosphatase. Probable identity with calcineurin (CaM-BP₈₀). *FEBS Lett.* 137, 80-84.
- STOCKDALE, M., DAWSON, A.P. & SELWYN, M.J. (1970). Effects of trialkyltin and triphenyltin compounds on mitochondrial respiration. *Eur. J. Biochem.* 15, 342-351.

- STORM, D.R., ROSENTHAL, K.S. & SWANSON, P.E. (1977). Polymyxin and related antibiotics.
Ann. Rev. Biochem. 46, 723-763.
- STOUT, R.G. & CLELAND, R.E. (1982). Evidence for a Cl^- - stimulated Mg ATPase proton pump in oat root membranes.
Plant Physiol. 69, 798-803.
- STOUT, R.G., JOHNSON, K.D. & RAYLE, D.L. (1978). Rapid auxin- and fusicoccin-enhanced Rb^+ uptake and malate synthesis in *Avena* coleoptile sections.
Planta 139, 35-41.
- STROOBANT, P. & SCARBOROUGH, G.E. (1979). Active transport of calcium in *Neurospora* plasma membrane vesicles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3102-3106.
- SUSSMAN, M.R. & GOLDSMITH, M.H.M. (1981 a). Auxin uptake and action of N-1-naphthylphthalamic acid in corn coleoptiles.
Planta 151, 15-25.
- SUSSMAN, M.R. & GOLDSMITH, M.H.M. (1981 b). The action of specific inhibitors of auxin transport on uptake of auxin and binding of 1-N-naphthylphthalamic acid to a membrane site in maize coleoptiles.
Planta 152, 13-18.
- SUSSMAN, M.R. & KENDE, H. (1978). *In vitro* cytokinin binding to a particulate fraction of tobacco cells.
Planta 140, 251-259.
- SWARUP, G., COHEN, S. & GARBERS, D.L. (1981). Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatases.
J. Biol. Chem. 256, 8197-8201.
- SWARUP, G., COHEN, S. & GARBERS, D.L. (1982). Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1104-1109.

- SZE, H. (1980). Nigericin-stimulated ATPase activity in microsomal vesicles of tobacco callus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5904-5908.
- SZE, H. (1982). Characterization of nigericin-stimulated ATPase from sealed microsomal vesicles of tobacco callus.
Plant Physiol. 70, 498-505.
- TAGUCHI, T. & KASAI, M. (1980). Identification of an anion channel protein from electric organ of *Marke japonica*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1088-1094.
- TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., IWASA, Y., KAWAHARA, Y., MORI, T. & NISHIZUKA, Y. (1979 a). Calcium-dependent activation of a multi-functional protein kinase by membrane phospholipids.
J. Biol. Chem. 254, 3692-3695.
- TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., KIKKAWA, U., MORI, T. & NISHIZUKA, Y. (1979 b). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1218-1224.
- THIMANN, K.V. (1977). Hormone Action in the Whole Life of Plants.
University of Massachusetts Press, Amherst.
- TREWAVAS, A.J. (1982). Growth substance sensitivity: The limiting factor in plant development.
Physiol. Plant. 55, 60-72.
- TRILLMICH, K. & MICHALKE, W. (1979). Kinetic characterization of N-1-naphthylphthalamic acid binding sites from maize coleoptile homogenates.
Planta 145, 119-127.
- TYSON, C.A., VAN DE ZANDE, H. & GREEN, D.E. (1976). Phospholipids as ionophores.
J. Biol. Chem. 251, 1326-1332.

- TZAGOLOFF, A. & MACINO, G. (1979). Mitochondrial genes and translation products.
Ann. Rev. Biochem. 48, 419-441.
- UENO, T. & SEKINE, T. (1981 a). A role of H^+ flux in active Ca^{2+} transport into sarcoplasmic reticulum vesicles. I. Effect of an artificially imposed H^+ gradient on Ca^{2+} uptake.
J. Biochem. 89, 1239-1246.
- UENO, T. & SEKINE, T. (1981 b). A role of H^+ flux in active Ca^{2+} transport into sarcoplasmic reticulum vesicles. II. H^+ ejection during Ca^{2+} uptake.
J. Biochem. 89, 1247-1252.
- VANDERKOOI, J.M., LANDESBURG, R., SELICK II, H. & MC DONALD, G.G. (1977). Interaction of general anesthetics with phospholipid vesicles and biological membranes.
Biochim. Biophys. Acta 464, 1-16.
- VAN STEVENINCK, R.F.M. (1976). Effects of hormones and related compounds on ion transport. In: PIRSON, A. & ZIMMERMANN, M.H. (Eds.). Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Vol. II. LÜTTGE, U. & PITTMAN, M.G. (Eds.). Transport in Plants II, Part B. pp 307-343. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- VARA, F. & SERRANO, R. (1983). Phosphorylated intermediate of the ATPase of plant plasma membranes.
J. Biol. Chem. 258, 5334-5336.
- VEEN, H. (1974). Specificity of phospholipid binding to indole acetic acid and other auxins.
Z. Naturforsch. 29 c, 39-41.
- VENIS, M.A. (1977). Solubilization and partial purification of auxin binding sites of corn membranes.
Nature 266, 268-269.

- VENIS, M.A. (1980). Purification and properties of membrane-bound auxin receptors in corn. In: SKOOG, G. (Ed.). Plant Growth Substances 1979. pp 61-70. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- VIANELLO, A., DELL'ANTONE, P. & MACRÌ, F. (1982). ATP-dependent and ionophore-induced proton translocation in pea stem microsomal vesicles. Biochim. Biophys. Acta 689, 89-96.
- VREUGDENHIL, D., BURGERS, A. & LIBBENGA, K.R. (1979). A particle-bound auxin receptor from tobacco pith callus. Plant Sci. Lett. 16, 115-121.
- WAGNER, G.J. & MULREADY, P. (1983). Characterization and solubilization of nucleotide-specific Mg^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -pyrophosphatase of tonoplast. Biochim. Biophys. Acta 728, 267-280.
- WALKER, R.R. & LEIGH, R.A. (1981). Characterization of a salt-stimulated ATPase activity associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). Planta 153, 140-149.
- WALLMARK, B., STEWART, H.B., RABON, E., SACCOMANI, G. & SACHS, G. (1980). The catalytic cycle of gastric ($H^{+} + K^{+}$)-ATPase. J. Biol. Chem. 255, 5313-5319.
- WALTON, J.D. & RAY, P.M. (1981). Evidence for receptor function of auxin binding sites in maize. Red light inhibition of mesocotyl elongation and auxin binding. Plant Physiol. 68, 1334-1338.
- WATTERSON, D.M., IVERSON, D.B. & VAN ELDIK, L.J. (1980). Spinach calmodulin: Isolation, characterization, and comparison with vertebrate calmodulins. Biochemistry 19, 5762-5768.
- WEIGL, J. (1969 a). Einbau von Auxin in gequollene Lecithinlamellen. Z. Naturforsch. 24 b, 365-366.

- WEIGL, J. (1969 b). Spezifität der Wechselwirkung zwischen Wuchsstoffen und Lecithin.
Z. Naturforsch. 24 b, 367-368.
- WEIGL, J. (1969 c). Wechselwirkung pflanzlicher Wachstums-
hormone mit Membranen.
Z. Naturforsch. 24 b, 1046-1052.
- WENT, F.W. (1928). Wuchsstoff und Wachstum.
Rec. Trav. bot. Néerl. 25, 1-116.
- WHITE, M.M. & MILLER, C. (1979). A voltage-gated anion
channel from the electric organ
of *Torpedo californica*.
J. Biol. Chem. 254, 10161-10166.
- WHITE, M.M. & MILLER, C. (1981). Chloride permeability of
membrane vesicles isolated from
Torpedo californica electroplax.
Biophys. J. 35, 455-462.
- WHITE, P.R. (1954). The Cultivation of Animal and Plant
Cells.
Ronald Press, New York.
- WICK, S.M. & HEPLER, P.K. (1980). Localization of Ca^{2+} -
containing antimonate precipitates
during mitosis.
J. Cell Biol. 86, 500-513.
- WIENECKE, K., GLAS, R. & ROBINSON, D.G. (1982). Organelles
involved in the synthesis and trans-
port of hydroxyproline-containing
glycoproteins in carrot root discs.
Planta 155, 58-63.
- WILLIAMSON, R.E. (1981). Free Ca^{2+} concentration in the
cytoplasm: a regulator of plant
cell function.
What's new in Plant Physiology 12,
45-48.
- WINTER, A. (1975). Isolierung von Zellkernen aus Suspen-
sionskulturen von *Daucus carota*.
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie,
Freie Universität Berlin.
- WISE, B.C., GLASS, D.B., CHOU, C.-H.J., RAYNOR, R.L.,
KATOH, N., SCHATZMAN, R.C., TURNER,
R.S., KIBLER, R.F. & KUO, J.F.
(1982 a). Phospholipid-sensitive
 Ca^{2+} -dependent protein kinase
from heart. II. Substrate specificity
and inhibition by various agents.
J. Biol. Chem. 257, 8489-8495.

- WISE, B.C., RAYNOR, R.L. & KUO, J.F. (1982 b). Phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase from heart. I. Purification and general properties. J. Biol. Chem. 257, 8481-8488.
- WRENN, R.W., KATOH, N., WISE, B.C. & KUO, J.F. (1980). Stimulation by phosphatidylserine and calmodulin of calcium-dependent phosphorylation of endogenous proteins from cerebral cortex. J. Biol. Chem. 255, 12042-12046.
- WRIGHT, L.Z. & RAYLE, D.L. (1983). Evidence for a relationship between H^+ excretion and auxin in shoot gravitropism. Plant Physiol. 72, 99-104.
- YANG, S.-D., TALLANT, E.A. & CHEUNG, W.Y. (1982). Calcineurin is a calmodulin-dependent protein phosphatase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1419-1425.
- YANG, S.F., FREER, S. & BENSON, A.A. (1967). Transphosphatidylolation by phospholipase D. J. Biol. Chem. 242, 477-484.
- YEH, L.-A., LING, L., ENGLISH, L. & CANTLEY, L. (1983). Phosphorylation of the (Na, K)-ATPase by a plasma membrane-bound protein kinase in Friend erythroleukemia cells. J. Biol. Chem. 258, 6567-6574.
- ZIMMERMANN, U., ASHCROFT, R.G., COSTER, H.G.L. & SMITH, J.R. (1977). The molecular organization of bimolecular lipid membranes. The effect of KCl of the location of indoleacetic acid in the membrane. Biochim. Biophys. Acta 469, 23-32.

7. Abbildungen und Tabellen

Die Abbildungen und Tabellen sind entsprechend ihrer Erwähnung im Text in chronologischer Folge angeordnet.

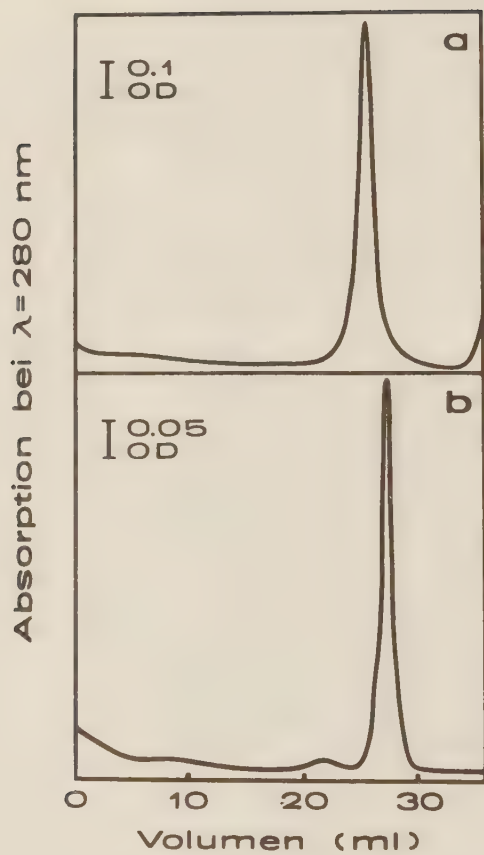


Abb. 1.

UV-Absorptionsprofile der mikrosomalen Membranen nach Zentrifugation im kontinuierlichen (a) und diskontinuierlichen (b) Saccharosedichtegradienten.

(a) Die mikrosomalen Membranen sedimentierten bei der isopyknischen Zentrifugation im kontinuierlichen linearen Dichtegradienten von 25-45 % (w/w) Saccharose als einheitliche Bande bei einer Schwebedichte von $\rho = 1.180 \text{ g cm}^{-3}$. Für den Versuch wurden isolierte mikrosomale Membranen aus 10 g Frischgewicht DC-Zellen auf einen Dichtegradienten gegeben, dessen Saccharose in einem gepufferten Medium mit 25 mmol l^{-1} PIPES-NaOH (pH 6.5) und 5 mmol l^{-1} MgCl_2 gelöst worden war. Nach der Zentrifugation von 14 h im Schwingbecherrotor SW 25.1 mit 90000 xg bei $+2^\circ\text{C}$ erfolgte die Fraktionierung des Saccharosegradienten mittels eines Dichtegradientenfraktionators des Typs ISCO Model 185. Die Position der Membranen im Gradienten ließ sich durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ mit einem Durchflußphotometer ISCO UA-5 bestimmen, und diese Fraktionen wurden für die Messung des Brechungsindex an einem ZEISS Refraktometer und damit für die Bestimmung der Saccharosekonzentration bzw. der Schwebedichte verwendet.

(b) Die Auftrennung der mikrosomalen Membranen aus DC-Zellen (hier entsprechend 6.25 g Frischgewicht) im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten zeigte eine geringe Kontamination der bei der Dichtestufe von $\rho = 1.210 \text{ g cm}^{-3}$ angereicherten mikrosomalen Membranen durch eine Membranfraktion bei der Dichtestufe von $\rho = 1.157 \text{ g cm}^{-3}$. Die Zentrifugation im Schwingbecherrotor SW 25.1 mit 90000 xg bei $+2^\circ\text{C}$ dauerte 2 h. Der diskontinuierliche Dichtegradient bestand aus 5 ml 45 %, 7.5 ml 35 % und 7.5 ml 25 % (w/w) Saccharose in dem gepufferten Medium der unter (a) genannten Zusammensetzung, so daß die entsprechenden Dichtestufen bei $\rho = 1.210, 1.157$ und 1.108 g cm^{-3} lagen. Der Gradient wurde, wie unter (a) beschrieben, fraktioniert.

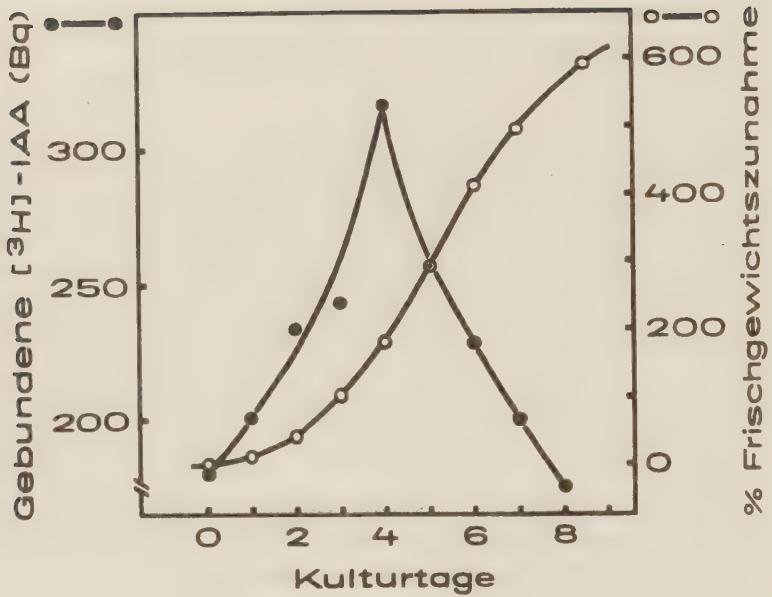


Abb. 2.

Modulation der Auxinbindungsaktivität von mikrosomalen Membranen im Verlauf eines Kulturzyklus von DC-Zellen.

An jedem Kulturtage eines 8-tägigen Kulturzyklus von DC-Zellen wurden die mikrosomalen Membranen isoliert und ihre Eigenschaft, Auxin zu binden, in vitro getestet. Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 1 g Frischgewicht DC-Zellen und 6 nmol l^{-1} [³H]-IAA in einem Puffer mit $25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5), $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$ und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation über 30 min bei $+35^\circ\text{C}$; Ultraschallsedimentation.

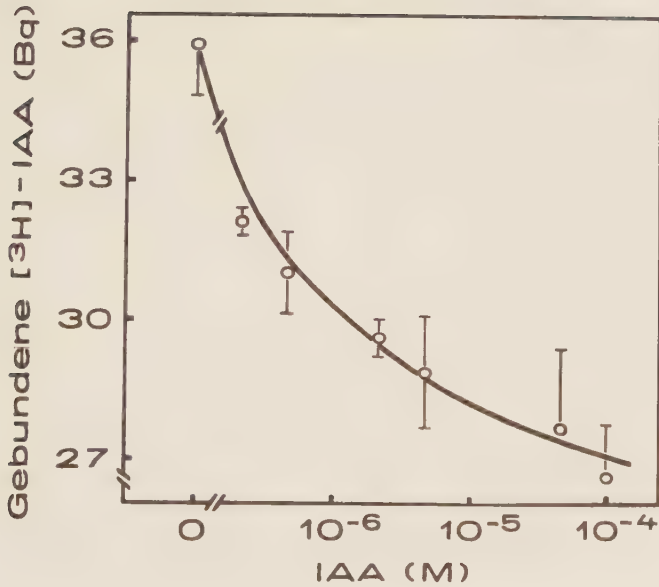


Abb. 3a.

Nachweis von kompetitiver Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 800 mg Frischgewicht DC-Zellen, 2.7 nmol l^{-1} [³H]-IAA und den angegebenen IAA-Konzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5), 5 mmol l^{-1} MgCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation über 30 min bei $+35^\circ\text{C}$; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

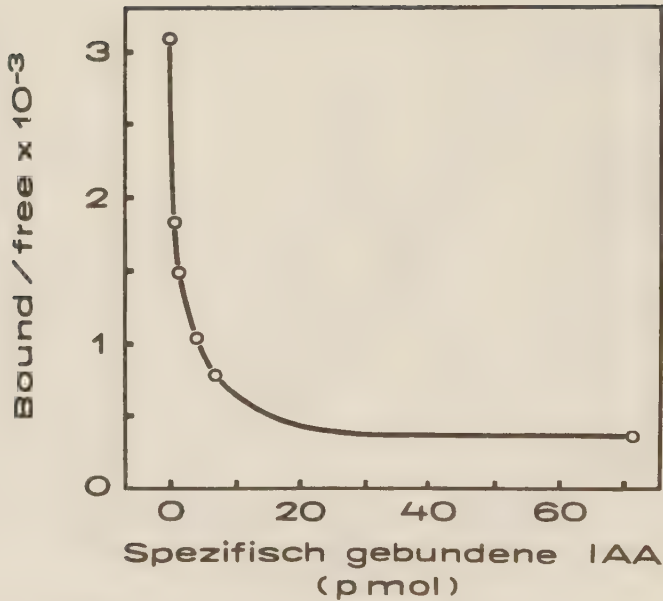


Abb. 3b.

SCATCHARD-Plot der kompetitiven Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.

Die Auftragung der Bindungsdaten aus dem Versuch von Abb. 3a im SCATCHARD-Plot ergibt eine hyperbolische Kurve. Bei der graphischen Auswertung des steilen Kurvenastes durch Anlegen einer Asymptoten läßt sich die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen mit $n = 2 \text{ pmol g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen und ihre Dissoziationskonstante mit $K_D = 280 \text{ nmol l}^{-1}$ bestimmen.

Tabelle 1.

Einfluß des Lösungsmittels auf die Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ	Auxinbindung (Bq)	relative Auxinbindung
(H ₂ O-Kontrolle)	78.54	43 $\pm$ 2	100 $\pm$ 5
Dimethylsulfoxid	46.70	44 $\pm$ 1	103 $\pm$ 3
Dimethylformamid	37.60	38 $\pm$ 1	88 $\pm$ 1
Acetonitril	37.50	36 $\pm$ 2	84 $\pm$ 5
Ethanol	24.30	35 $\pm$ 1	82 $\pm$ 2

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 800 mg Frischgewicht DC-Zellen, 310 nmol l⁻¹ [¹⁴C]-NAA und 1 % (v/v) der angegebenen Lösungsmittel in einem Puffer mit 25 mmol l⁻¹ KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 5.5), 5 mmol l⁻¹ MgCl₂ und 250 mmol l⁻¹ Saccharose; Inkubation über 30 min bei +2°C; Ölphasensedimentation. Angabe der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

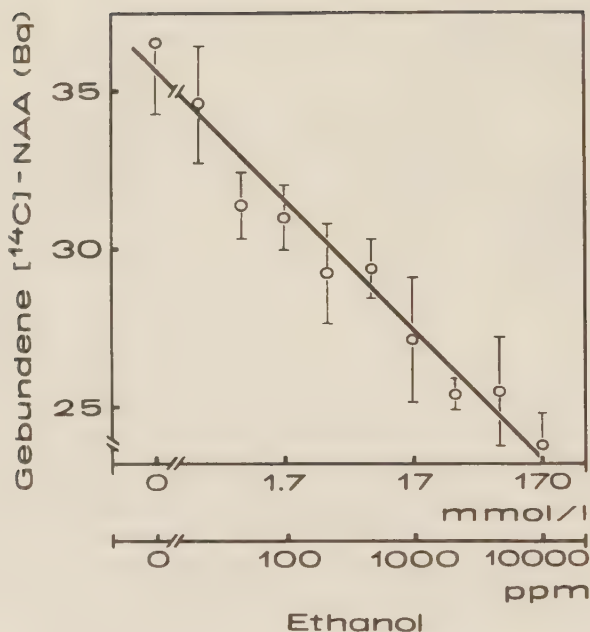


Abb. 4.

Empfindlichkeit der hochaffinen Auxinbindung an mikrosomalen Membranen gegenüber Ethanol.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 800 mg Frischgewicht DC-Zellen, 300 nmol l^{-1} [¹⁴C]-NAA und den angegebenen Ethanolkonzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5), 5 mmol l^{-1} MgCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation < 1 min bei +2°C; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

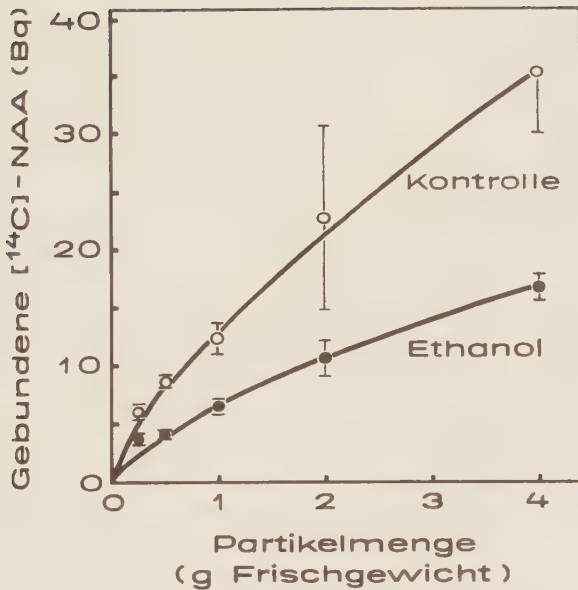


Abb. 5.

Abhängigkeit der ethanol sensitiven Auxinbindung von der Konzentration an mikrosomalen Membranen.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit den angegebenen Konzentrationen an mikrosomalen Membranen und 375 nmol l^{-1} $[^{14}\text{C}]$ -NAA in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5), 5 mmol l^{-1} MgCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von 1 % (v/v) Ethanol; Inkubation < 1 min bei $+2^\circ\text{C}$; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

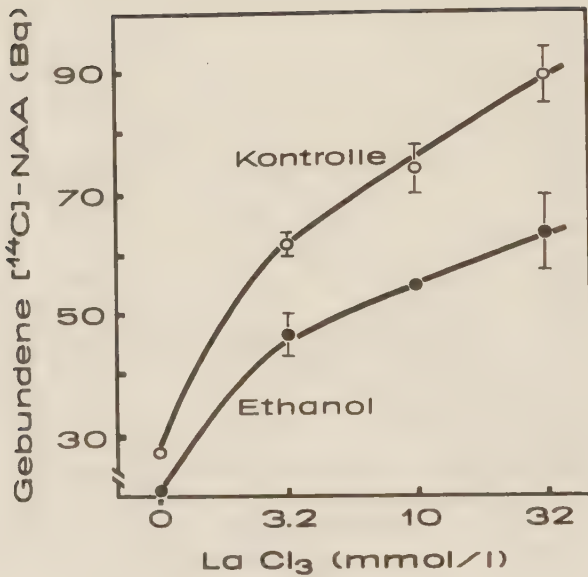


Abb. 6.

La³⁺-Stimulation der ethanol sensitiven Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 1.25 g Frischgewicht DC-Zellen, 250 nmol l⁻¹ [¹⁴C]-NAA und den angegebenen La³⁺-Konzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l⁻¹ PIPES-NaOH (pH 5.5), 5 mmol l⁻¹ MgCl₂ und 250 mmol l⁻¹ Saccharose ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von 1 % (v/v) Ethanol ; Inkubation < 1 min bei +20°C; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

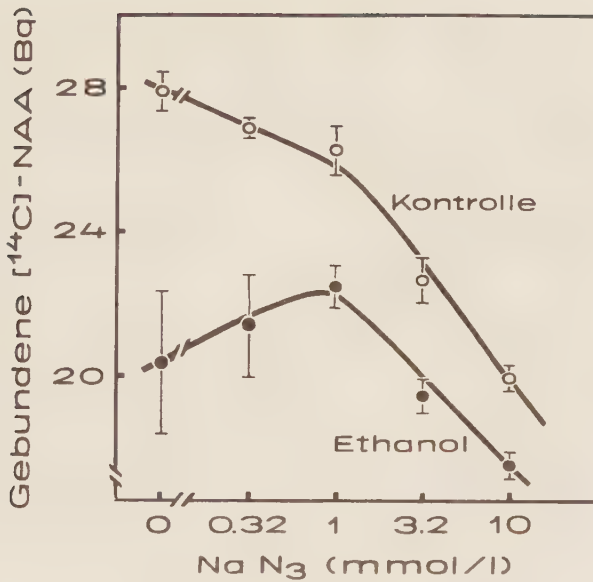


Abb. 7.

Wirkung von $\text{N}_3^\ominus$ auf die ethanolsensitive Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 700 mg Frischgewicht DC-Zellen, 300 nmol l^{-1} [^{14}C]-NAA und den angegebenen $\text{N}_3^\ominus$ -Konzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5), 5 mmol l^{-1} MgCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von 1 % (v/v) Ethanol ; Inkubation < 1 min bei $+2^\circ\text{C}$; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

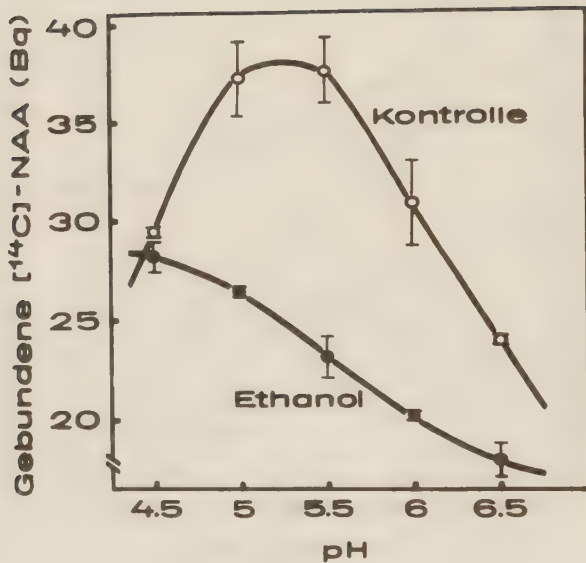


Abb. 8.

pH-Abhängigkeit der ethanol sensitiven Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 800 mg Frischgewicht DC-Zellen, 330 nmol l^{-1} [^{14}C]-NAA und bei den angegebenen pH-Werten in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 5 mmol l^{-1} MgCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von 1 % (v/v) Ethanol; Inkubation < 1 min bei $+2^\circ\text{C}$; Ultraschallsedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

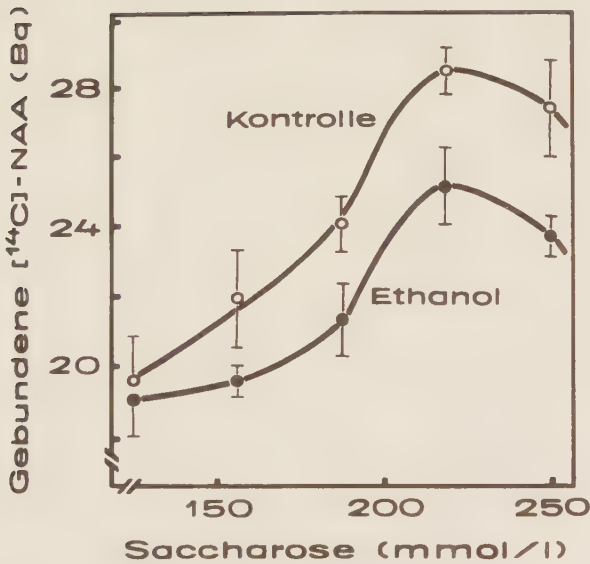


Abb. 9.

Wirkung des osmotischen Wertes im Inkubationsmedium auf die ethanol-sensitive Auxinbindung an mikrosomalen Membranen.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 800 mg Frischgewicht DC-Zellen, 320 nmol l^{-1} [^{14}C]-NAA und den angegebenen Saccharosekonzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5) und 5 mmol l^{-1} MgCl_2 ohne (Kontrolle) und mit Zusatz von 1 % (v/v) Ethanol; Inkubation über 30 min bei $+2^\circ\text{C}$; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

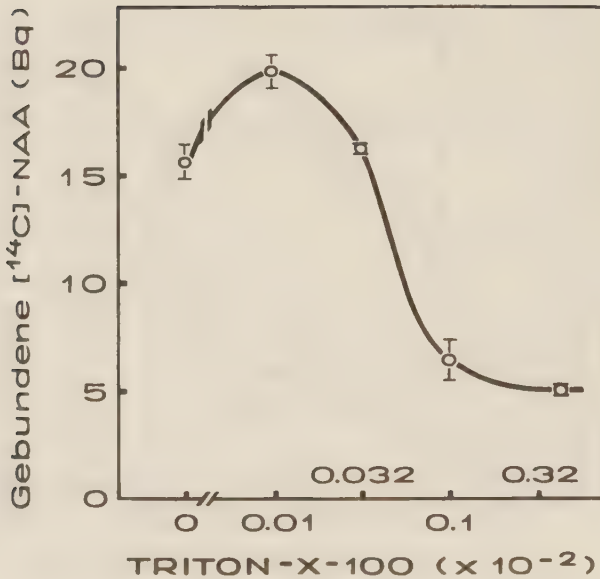


Abb. 10.

Empfindlichkeit der Auxinbindung an mikrosomalen Membranen gegenüber TRITON-X-100.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit mikrosomalen Membranen aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen, 340 nmol l^{-1} $[^{14}\text{C}]\text{-NAA}$ und den als Volumenverhältnis angegebenen Detergenzkonzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5), 5 mmol l^{-1} MgCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation über 30 min bei $+20^\circ\text{C}$; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

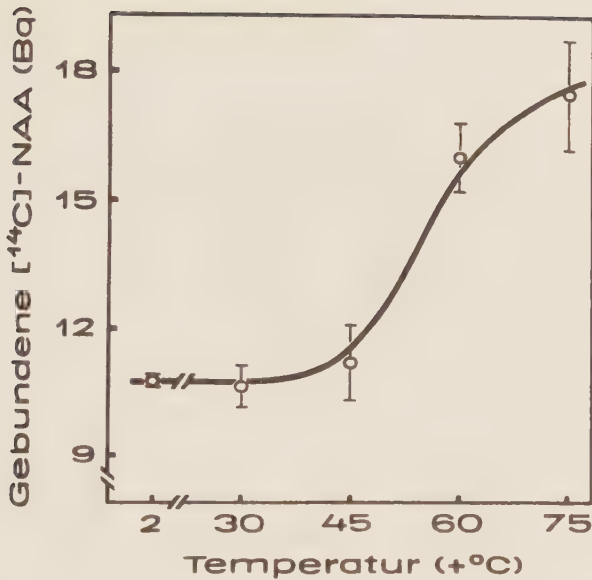


Abb. 11.

Stimulation der ethanol sensitiven Auxinbindung nach einer Vorinkubation der mikrosomalen Membranen bei erhöhten Temperaturen.

Versuchsbedingungen: Vorinkubation der mikrosomalen Membranen über 15 min bei den angegebenen Temperaturen in einem Puffer mit 25 mmol l⁻¹ KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 5.5), 5 mmol l⁻¹ MgCl₂ und 250 mmol l⁻¹ Saccharose; anschließend Auxinbindungstest mit Membranen aus 800 mg Frischgewicht DC-Zellen und 270 nmol l⁻¹ [¹⁴C]-NAA im Puffer der genannten Zusammensetzung ohne bzw. mit Zusatz von 1 % (v/v) Ethanol; Inkubation < 1 min bei +2°C; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung der ethanol sensitiven Auxinbindung, d.h. der Differenz der Auxinbindung in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 % (v/v) Ethanol, von drei parallelen Testansätzen.

Absorption bei $\lambda = 546 \text{ nm}$

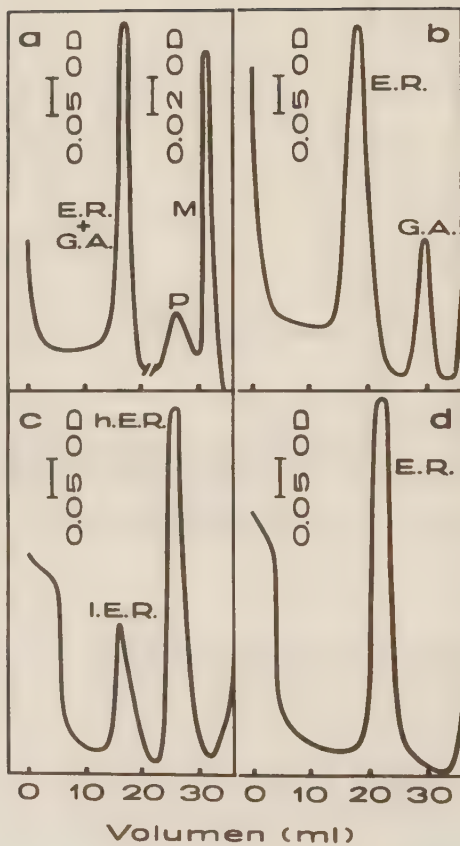


Abb. 12.

Absorptionsprofile von subzellulären Membranen nach ihrer Auftrennung durch Zentrifugation im diskontinuierlichen RENOGRAFIN-Dichtegradienten.

Die einzelnen subzellulären Membranfraktionen ließen sich durch die Zentrifugation des 2000 xg-überstandes des Homogenisates von DC-Zellen im diskontinuierlichen RENOGRAFIN-Dichtegradienten, dessen Zusammensetzung dem jeweiligen Trennungsproblem angepaßt wurde, auftrennen. Die Zentrifugation wurde im Schwingbecherrotor AH 627 mit 120000 xg über 2 h bei +2°C durchgeführt. Die Fraktionierung der Dichtegradienten erfolgte mit der Methodik, die im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben wurde. Für die Identifizierung der einzelnen subzellulären Membranfraktionen wurden die von BOSS & RUESINK (1979) angegebenen Schwebedichten von definierten Membranen aus DC-Zellen verwendet.

(a) Auftrennung von Membranen des Plasmalemma (P) und der Mitochondrien (M) im diskontinuierlichen Dichtegradienten mit 3 ml 37 %, 6 ml 27 % und 9 ml 23 % (w/v) RENOGRAFIN, d.h. mit den Dichtestufen von $\rho = 1.210$, 1.146 und 1.122 g cm^{-3} .

(b) Auftrennung von Membranen des E.R. und G.A. im diskontinuierlichen Dichtegradienten mit 6 ml 23 % und 12 ml 18 % (w/v) RENOGRAFIN, d.h. bei den Dichtestufen von $\rho = 1.122$ und 1.093 g cm^{-3} .

(c) Auftrennung von Membranen des E.R. in eine leichte (l.E.R.) und schwere Fraktion (h.E.R.) im diskontinuierlichen Dichtegradienten mit 10 ml 18% und 8 ml 10 % (w/v) RENOGRAFIN, d.h. bei den Dichtestufen von $\rho = 1.093$ und 1.049 g cm^{-3} .

(d) Isolierung von Membranen des E.R. bei einer Dichtestufe von $\rho = 1.093 \text{ g cm}^{-3}$ entsprechend einer 18 % (w/v) RENOGRAFIN-Lösung.

Tabelle 2.

Subzelluläre Lokalisation der Auxinbindung in DC-Zellen.

RENOGRAFIN (%, w/v) [†]	Dichte (g cm ⁻³) [†]	Membran- fraktion [†]	Auxinbindung (Bq)			
			g ⁻¹ Frischgew.		mg ⁻¹ Protein	
			A	B	A	B
18	1.093	E.R.	36 ± 1	29 ± 1	74 ± 2	61 ± 1
10	1.049	l.E.R.	4 ± 0	3 ± 0	8 ± 0	7 ± 0
18	1.093	h.E.R.	32 ± 2	26 ± 2	66 ± 5	54 ± 4
23	1.122	G.A.	12 ± 0	12 ± 1	63 ± 1	64 ± 3
27	1.146	P	2 ± 0	2 ± 0	36 ± 1	36 ± 2
37	1.211	M	2 ± 0	2 ± 0	35 ± 4	35 ± 1

[†] in Anlehnung an BOSS & RUESINK (1979)

Versuchsbedingungen: Auftrennung des 2000 xg-Überstandes des Homogenisats von DC-Zellen durch Zentrifugation im diskontinuierlichen RENOGRAPHIN-Dichtegradienten (s. Abb. 12); Auxinbindungstest mit den einzelnen, in der Schwebbedichte definierten Membranfraktionen und 5 nmol l⁻¹ [³H]-IAA ohne (A) und mit Zusatz (B) von 100 µmol l⁻¹ IAA in einem Puffer mit 25 mmol l⁻¹ KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 5.5), 5 mmol l⁻¹ MgCl₂ und 250 mmol l⁻¹ Saccharose; Inkubation über 30 min bei +25°C; Ölphasensedimentation. Angabe der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei parallelen Testansätzen.

Tabelle 3.

Nachweis der Antimycin A-resistenten NADPH-Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.2.3) an isolierten Membranen mit einer Schwebbedichte von $\rho < 1.093 \text{ g cm}^{-3}$ im RENOGRAFİN-Dichtegradienten.

Testbedingungen	Enzymaktivität (nmol min^{-1})	
	g^{-1} Frischgewicht	mg^{-1} Protein
Kontrolle	21.6	75.8
KCN	24.8	87.0
Antimycin A	22.4	78.6
KCN + Antimycin A	24.8	87.0

Versuchsbedingungen: Bestimmung der Enzymaktivität mit dem im Abschnitt "Material und Methoden" angegebenen Testansatz nach HODGES & LEONARD (1974); Inkubation von isolierten Membranen aus 125 mg Frischgewicht DC-Zellen pro Testansatz bei $+25^{\circ}\text{C}$; Messung der Enzymaktivität an einem Zweistrahlphotometer des Typs ZEISS DM 4 und kontinuierliche Registrierung der Meßwerte mit einem Schreiber SERVOGOR S.

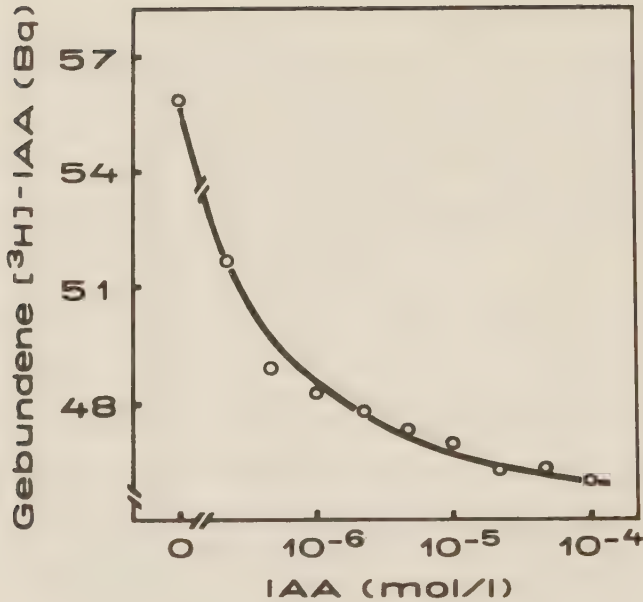


Abb. 13a.

Nachweis von kompetitiver Auxinbindung an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit Membranen des E.R. aus 1.6 g Frischgewicht DC-Zellen, 3.9 nmol l^{-1} [³H]-IAA und den angegebenen IAA-Konzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 5.5), 5 mmol l^{-1} MgCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation über 30 min bei $+35^\circ\text{C}$; Ulphasenssedimentation.

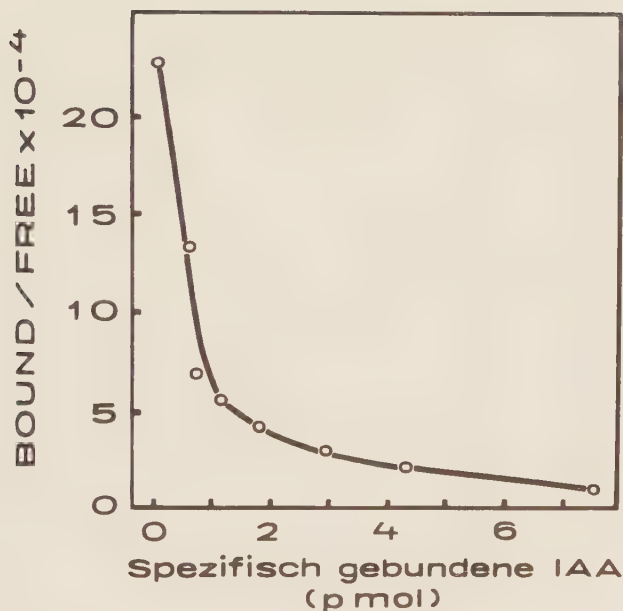


Abb. 13b.

SCATCHARD-Plot der kompetitiven Auxinbindung an Membranen des E.R.

Die Auftragung der Bindungsdaten aus dem Versuch der Abb. 13a im SCATCHARD-Plot ergibt eine hyperbolische Kurve. Bei der graphischen Auswertung des steilen Kurvenastes durch Anlegen einer Asymptoten läßt sich die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen mit $n = 640 \text{ fmol g}^{-1}$ Frischgewicht DC-Zellen und ihre Dissoziationskonstante mit $K_D = 500 \text{ nmol l}^{-1}$ bestimmen.

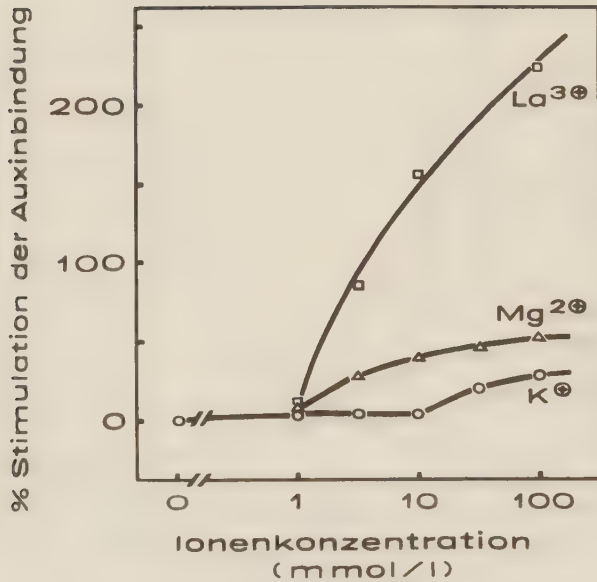


Abb. 14.

Kationenstimulation der hochaffinen Auxinbindung an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit Membranen des E.R. aus 1.5 g Frischgewicht DC-Zellen, 3.5 nmol l^{-1} [^3H]-IAA und den angegebenen Konzentrationen von Chloridsalzen der genannten Metallkationen in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} PIPES-TRIS (pH 5.5) und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation über 30 min bei $+25^\circ\text{C}$; Ultraschallsedimentation.

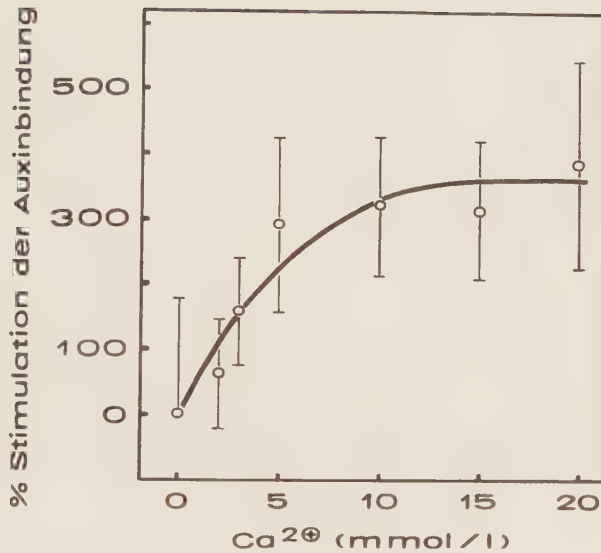


Abb. 15.

Ca²⁺-Stimulation der kompetitiven Auxinbindung an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit Membranen des E.R. aus 1.25 g Frischgewicht DC-Zellen, 5.2 nmol l⁻¹ [³H]-IAA ohne bzw. mit Zusatz von 100 µmol l⁻¹ IAA und den angegebenen Ca²⁺-Konzentrationen in einem Puffer mit 25 mmol l⁻¹ PIPES-TRIS (pH 5.5) und 250 mmol l⁻¹ Saccharose; Inkubation über 30 min bei +25°C; Ultraschallsedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung der kompetitiven Auxinbindung, d.h. der Differenz der Auxinbindung in Ab- bzw. Anwesenheit von unmarkiertem Auxin, von jeweils drei parallelen Testansätzen.

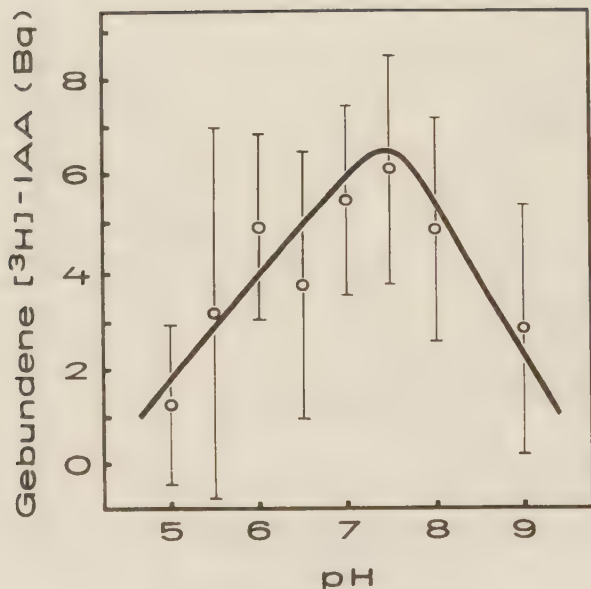


Abb. 16.

pH-Abhängigkeit der kompetitiven Auxinbindung an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit Membranen des E.R. aus 1 g Frischgewicht DC-Zellen, 2.6 nmol l^{-1} $[^3\text{H}]\text{-IAA}$ ohne bzw. mit Zusatz von $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ IAA bei den angegebenen pH-Werten in einem Puffer mit 50 mmol l^{-1} BIS-TRIS-PROPAN, 10 mmol l^{-1} CaCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation über 30 min bei $+25^\circ\text{C}$; Ölphasensedimentation. Darstellung der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung der kompetitiven Auxinbindung, d.h. der Differenz der Auxinbindung in Ab- bzw. Anwesenheit von unmarkiertem Auxin, von jeweils drei parallelen Testansätzen.

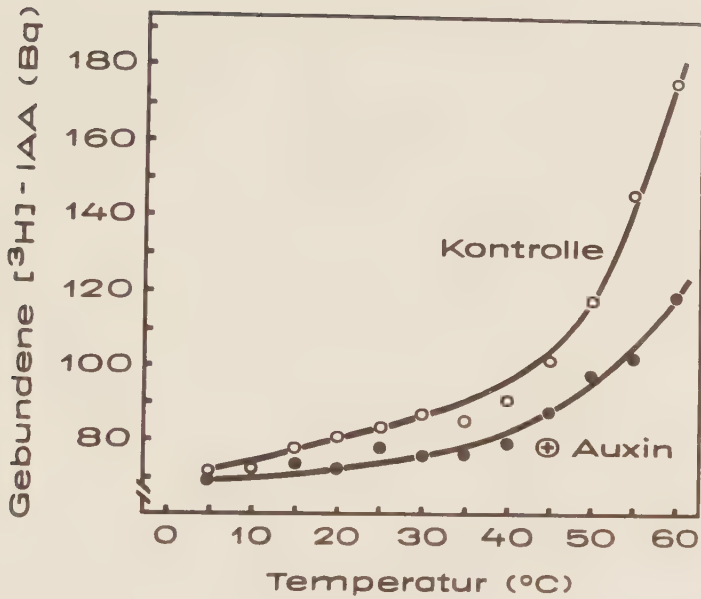


Abb. 17.

Temperaturabhängigkeit der kompetitiven Auxinbindung an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Auxinbindungstest mit Membranen des E.R. aus 1.25 g Frischgewicht DC-Zellen mit 5 nmol l^{-1} [³H]-IAA ohne bzw. mit Zusatz von $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ IAA in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} PIPES-TRIS (pH 5.5), 10 mmol l^{-1} CaCl_2 und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Inkubation über 20 min bei den angegebenen Temperaturen; Ölphasensedimentation.

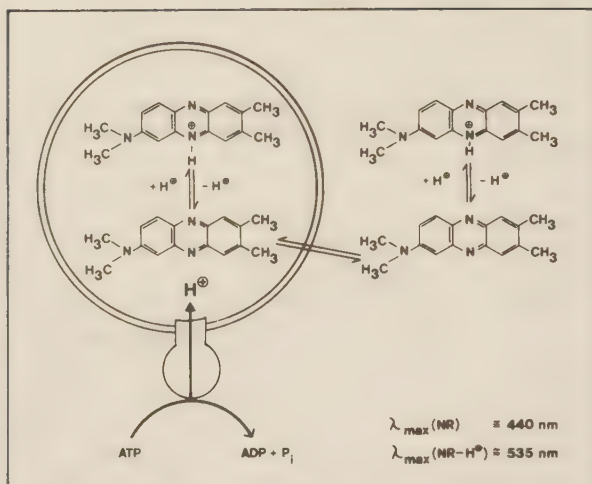
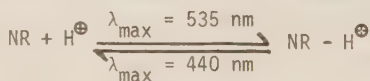


Abb. 18.

Prinzip der Neutralrotmethode nach HAGER et al. (1980) zur photometrischen Messung von intravesikulärer Ansäuerung.

Vor Beginn eines Versuches zur Protonentranslokation hat sich der lipophile Farbstoff Neutralrot zu beiden Seiten der Vesikelmembran äquibriert. Bei Ansäuerung des Vesikellumens z.B. durch die Aktivität einer protonentranslozierenden ATPase werden Neutralrotmoleküle protoniert und damit impermeabel für einen Durchtritt durch die Vesikelmembran. Entsprechend diffundieren weitere unprotonierte Farbstoffmoleküle in das Vesikellumen bis zur erneuten Einstellung des Konzentrationsgleichgewichts beiderseits der Membran. Die Ansäuerung des Vesikellumens führt also zu einer allmählichen Anreicherung des Farbstoffes im Vesikellumen. Zudem ändern sich die Absorptionseigenschaften von Neutralrot in der protonierten Form:



Beide Phänomene als Auswirkung der Protonentranslokation in das Vesikellumen lassen sich bei der photometrischen Messung des Reaktionsansatzes mit ATP (Meßküvette) gegen den Reaktionsansatz mit ADP (Vergleichsküvette) im Differenzspektrum verfolgen.

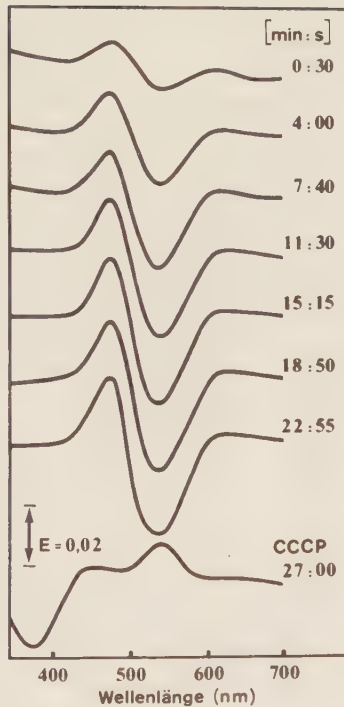


Abb. 19.

Zeitabhängige Veränderungen im Differenzspektrum von Neutralrot (NR) als Folge einer ATP-abhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranvesikeln des E.R.
(1.) Nachweis einer Protonenpumpe mit den Versuchsbedingungen nach HAGER et al. (1980).

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} HEPES-KOH (pH 7.0), 50 mmol l^{-1} KCl, 1 mmol l^{-1} MgCl_2 , 0.1 % (w/v) Rinderserumalbumin, $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR und je 1 mmol l^{-1} TRIS-ADP bzw. TRIS-ATP in der Vergleichs- bzw. Meßküvette; Zugabe von $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ CCCP nach Aufbau des pH-Gradienten; Inkubation bei $+20^\circ\text{C}$. Die angegebenen Zeiten für die Registrierung der Differenzspektren beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zugabe von ATP in die Meßküvette.

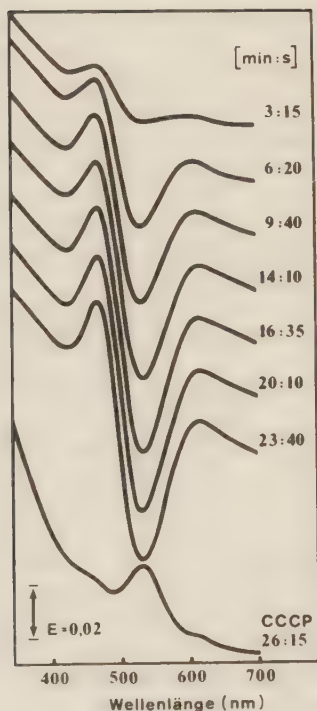


Abb. 20.

Zeitabhängige Veränderungen im Differenzspektrum von Neutralrot (NR) als Folge einer ATP-abhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranvesikeln des E.R.

(2.) Erhöhte Aktivität der Protonenpumpe bei veränderten Inkubationsbedingungen (pH 6.5 und +25°C).

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l⁻¹ HEPES-KOH (pH 6.5), 50 mmol l⁻¹ KCl, 1 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.1 % (w/v) Rinderserumalbumin, 30 µmol l⁻¹ NR und je 1 mmol l⁻¹ TRIS·ADP bzw. TRIS·ATP in der Vergleichs- bzw. Meßküvette; Zugabe von 10 µmol l⁻¹ CCCP nach Aufbau des pH-Gradienten; Inkubation bei +25°C. Die angegebenen Zeiten für die Registrierung der Differenzspektren beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zugabe von ATP in die Meßküvette.

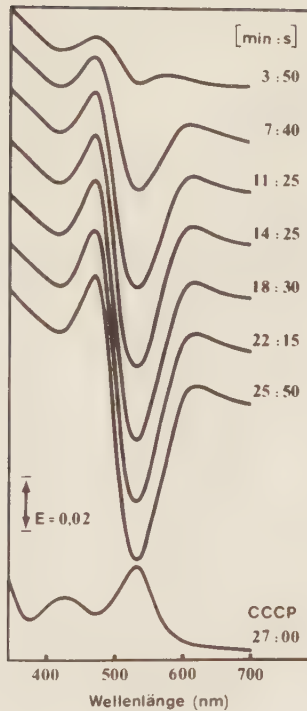


Abb. 21.

Zeitabhängige Veränderungen im Differenzspektrum von Neutralrot (NR) als Folge einer ATP-abhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranvesikeln des E.R.

(3.) Austausch von HEPES gegen PIPES als Puffersubstanz im Inkubationsmedium.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 50 mmol l^{-1} KCl, 1 mmol l^{-1} MgCl_2 , 0.1 % (w/v) Rinderserumalbumin, $30 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ NR und je 1 mmol l^{-1} TRIS-ADP bzw. TRIS-ATP in der Vergleichs- bzw. Meßküvette; Zugabe von $10 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ CCCP nach Aufbau des pH-Gradienten; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$. Die angegebenen Zeiten für die Registrierung der Differenzspektren beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zugabe von ATP in die Meßküvette.

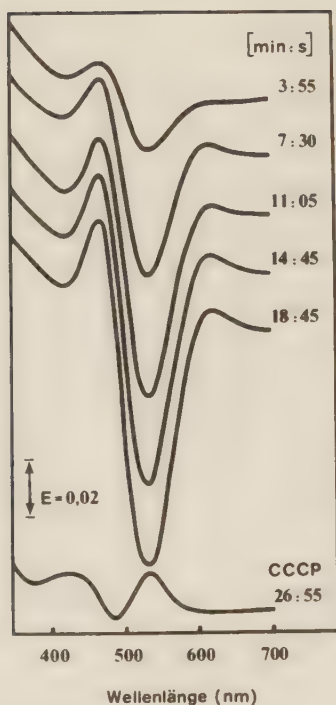


Abb. 22.

Zeitabhängige Veränderungen im Differenzspektrum von Neutralrot (NR) als Folge einer ATP-abhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranvesikeln des E.R.
(4.) Stimulation der Protonenpumpe nach Zusatz von Saccharose im Inkubationsmedium.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 1 mmol l^{-1} MgCl_2 , 0.1 % (w/v) Rinderserumalbumin, $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR und je 1 mmol l^{-1} TRIS-ADP bzw. TRIS-ATP in der Vergleichs- bzw. Meßküvette; Zugabe von $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ CCCP nach Aufbau des pH-Gradienten; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$. Die angegebenen Zeiten für die Registrierung der Differenzspektren beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zugabe von ATP in die Meßküvette.

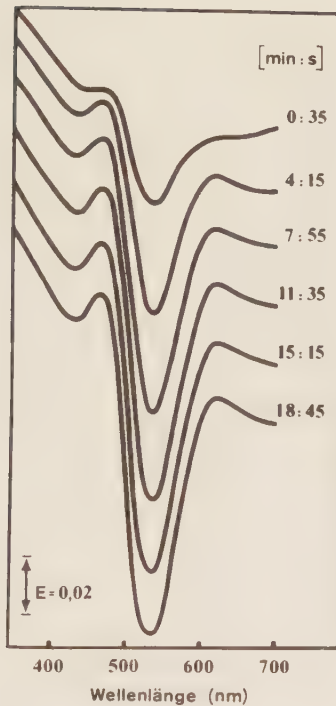


Abb. 23.

Zeitabhängige Veränderungen im Differenzspektrum von Neutralrot (NR) als Folge einer ATP-abhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranvesikeln des E.R.
(5.) Protonentranslokation ohne Zusatz von Rinderserumalbumin als Puffersubstanz im Inkubationsmedium.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranen des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 1 mmol l^{-1} MgCl_2 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR und je 1 mmol l^{-1} TRIS-ADP bzw. TRIS-ATP in der Vergleichs- bzw. Meßküvette; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$. Die angegebenen Zeiten für die Registrierung der Differenzspektren beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zugabe von ATP in die Meßküvette.

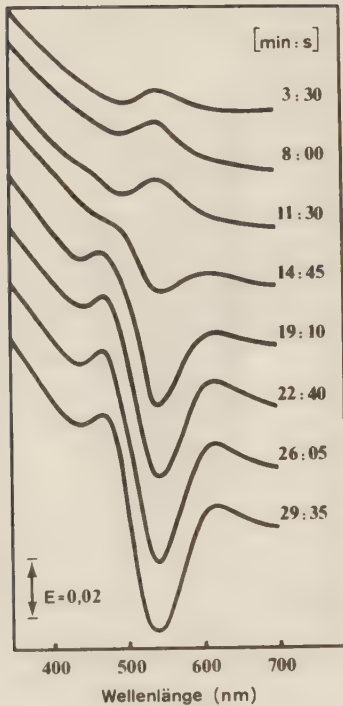


Abb. 24.

Zeitabhängige Veränderungen im Differenzspektrum von Neutralrot (NR) als Folge einer ATP-abhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranvesikeln des E.R.

(6.) Aktivität der Protonenpumpe nur bei Anwesenheit von Mg^{2+} im Inkubationsmedium.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen; Start der Reaktion in dem gepufferten Medium der in Abb. 23 genannten Zusammensetzung, aber ohne Zusatz von $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$; Zugabe von Mg^{2+} nach 14:45 (min:s); Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$. Die angegebenen Zeiten für die Registrierung der Differenzspektren beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zugabe von ATP in die Meßküvette.

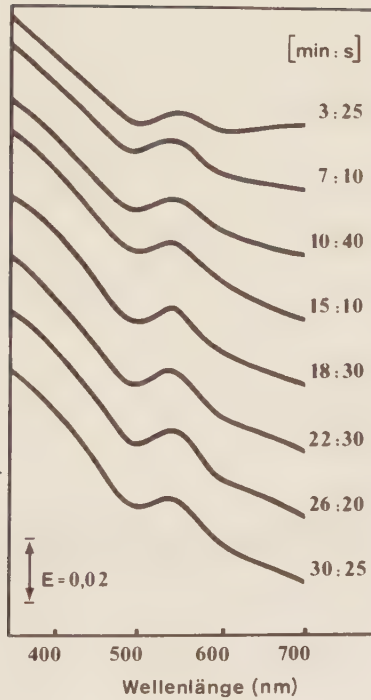


Abb. 25.

Zeitabhängige Veränderungen im Differenzspektrum von Neutralrot (NR) als Folge einer ATP-abhängigen Protonentranslokation an isolierten Membranvesikeln des E.R.
(7.) Keine Protonentranslokation bei Anwesenheit von $\text{Ca}^{2\oplus}$ statt $\text{Mg}^{2\oplus}$ im Inkubationsmedium.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen; Start der Reaktion in dem gepufferten Medium der in Abb. 23 genannten Zusammensetzung aber ohne Zusatz von $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ MgCl}_2$; Zugabe von CaCl_2 nach 15:10 (min:s); Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$. Die angegebenen Zeiten für die Registrierung der Differenzspektren beziehen sich auf den Zeitpunkt der Zugabe von ATP in die Meßküvette.

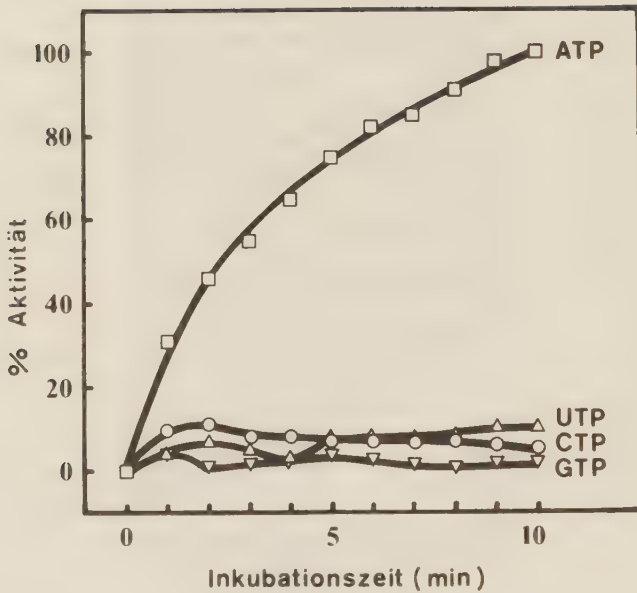


Abb. 26.

Spezifität der Protonenpumpe am E.R. für ATP als Energiesubstrat.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR und 4 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 4 mmol l^{-1} einer Substanz der Nukleotidtriphosphate $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$, $\text{Na}_2\cdot\text{CTP}$, $\text{Na}_2\cdot\text{GTP}$ oder $\text{Na}_3\cdot\text{UTP}$ in den Meßküvetten; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Aktivität der Protonenpumpe im Absorptionsmaximum des protonierten NR-Moleküls bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

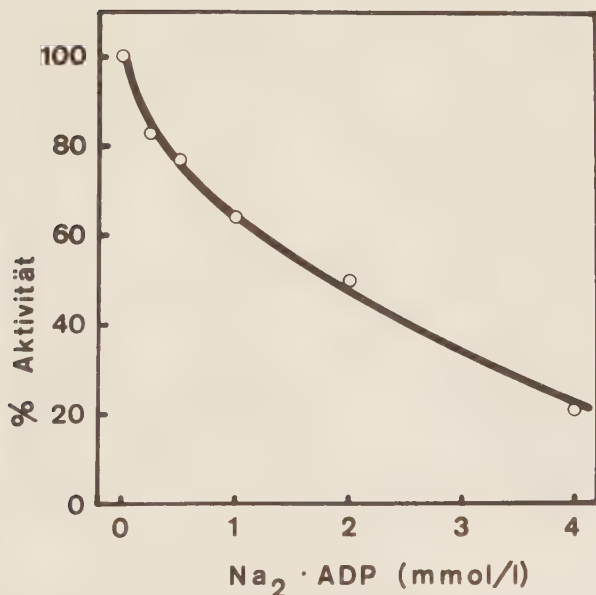


Abb. 27.

Hemmung der ATP-abhängigen Protonentranslokation an Membranen des E.R. durch ADP.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2 \cdot \text{ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2 \cdot \text{ATP}$ und den angegebenen Konzentrationen an $\text{Na}_2 \cdot \text{ADP}$ in den Meßküvetten; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Aktivität der Protonenpumpe im Absorptionsmaximum des protonierten NR-Moleküls bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

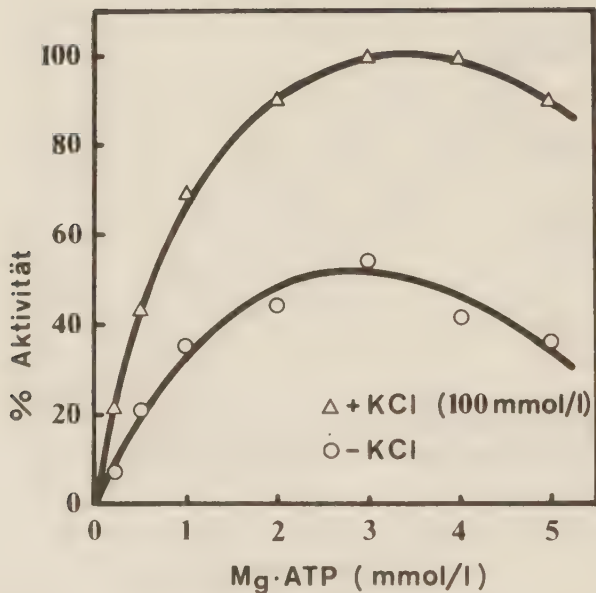


Abb. 28.

Aktivität der Protonenpumpe in Abhängigkeit von der Konzentration des Energiesubstrats Mg·ATP.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, den angegebenen Konzentrationen an Mg·ATP, d.h. an MgCl_2 und an $\text{Na}_2\text{·ATP}$, ohne bzw. mit Zusatz von 100 mmol l^{-1} KCl in den Meßküvetten; Vergleichsküvetten mit Membranvesikeln in dem Puffer der genannten Zusammensetzung aber mit 2 mmol l^{-1} MgCl_2 und 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\text{·ADP}$ ohne bzw. mit Zusatz von 100 mmol l^{-1} KCl; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation im Absorptionsmaximum des protonierten NR-Moleküls bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

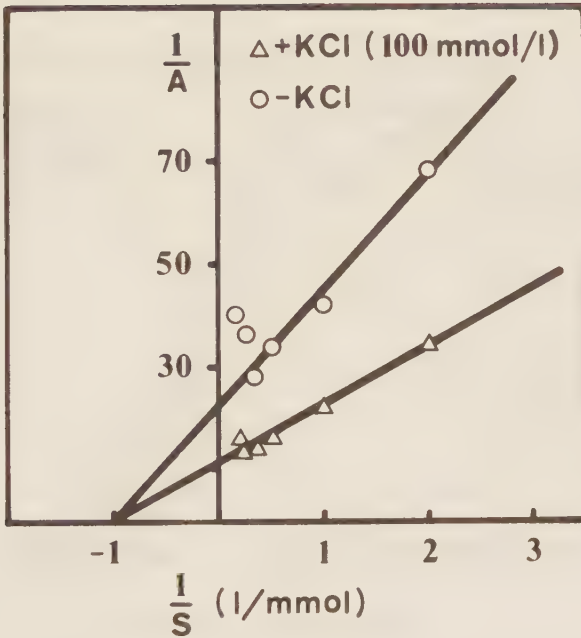


Abb. 29.

LINEWEAVER-BURK-Plot der Aktivität der Protonenpumpe in Abhängigkeit von der Konzentration des Energiesubstrats $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$.

Die Auftragung der Ergebnisse aus dem Versuch der Abb. 28 im LINEWEAVER-BURK-Plot ergibt für die Affinität der Protonenpumpe zum Energiesubstrat $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ einen $K_m \approx 1 \text{ mmol l}^{-1}$ unabhängig von der Ab- und Anwesenheit von KCl. Damit beruht die Stimulation der Protonentranslokation durch KCl auf einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, d.h. des $\text{H}^{\oplus}$ -Flux an der Membran des E.R.

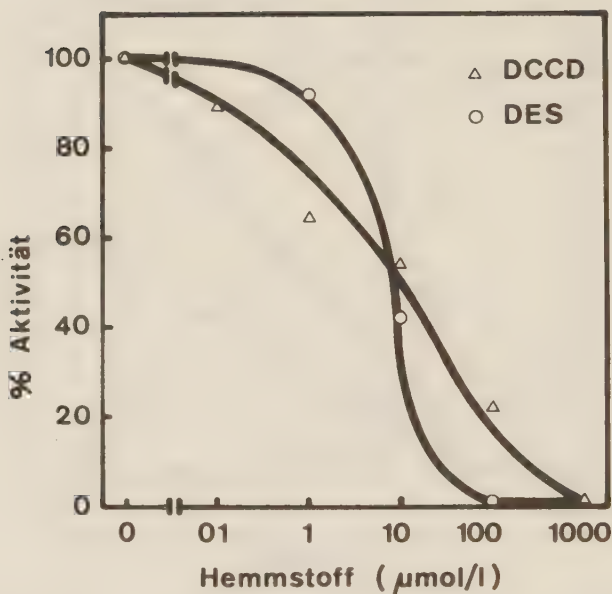


Abb. 30.

Hemmung der Aktivität der Protonenpumpe durch DCCD bzw. DES.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgCl_2 , 30 μmol l^{-1} NR, den angegebenen Konzentrationen von DCCD bzw. DES bei einer Ethanolkonzentration von 0.5% (v/v) und 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\text{-ATP}$ in der Meß- bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\text{-ADP}$ in der Vergleichsküvette; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

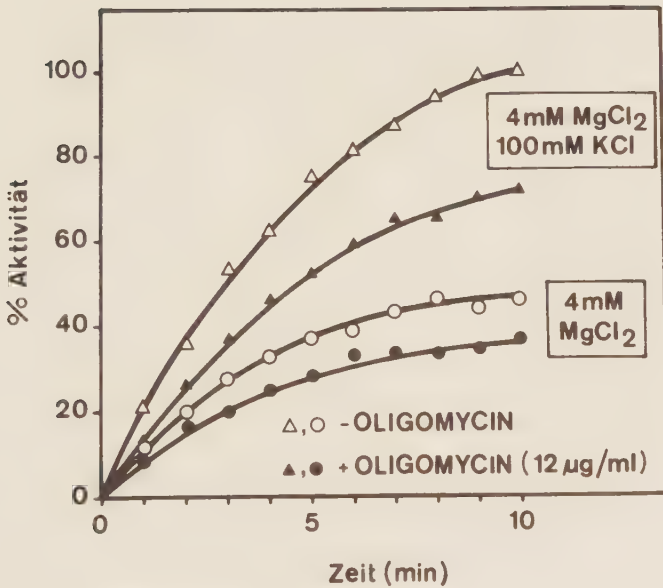


Abb. 31.

Empfindlichkeit der Aktivität der Protonenpumpe gegenüber Oligomycin.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l⁻¹ PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l⁻¹ Saccharose, 4 mmol l⁻¹ MgCl₂, 30 µmol l⁻¹ NR, ohne bzw. mit Zusatz von 100 mmol l⁻¹ KCl und 2 mmol l⁻¹ Na₂-ATP in der Meß- bzw. 2 mmol l⁻¹ Na₂-ADP in der Vergleichsküvette; Inkubation in Ab- und Anwesenheit von 12 µg ml⁻¹ Oligomycin bei +25°C; photometrische Messung der Protonentranslokation bei λ = 535 nm.

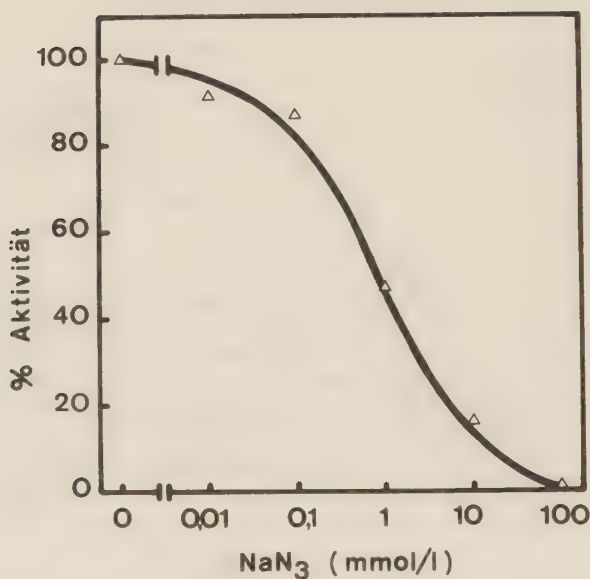


Abb. 32.

Hemmung der Aktivität der Protonenpumpe durch $\text{N}_3^\ominus$.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, den angegebenen Konzentrationen von NaN_3 und 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$ in der Meß- bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichsküvette; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

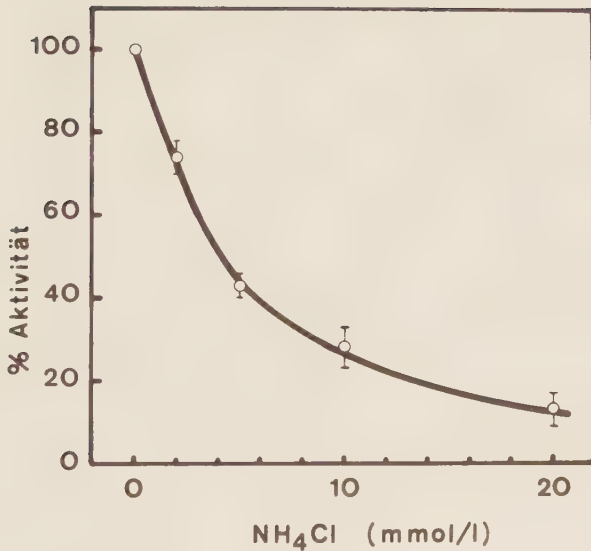


Abb. 33.

Abbau des durch die ATP-abhängige Protonentranslokation aufgebauten pH-Gradienten an Membranen des E.R. durch NH_4^+ .

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$ und den angegebenen Konzentrationen von NH_4Cl in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

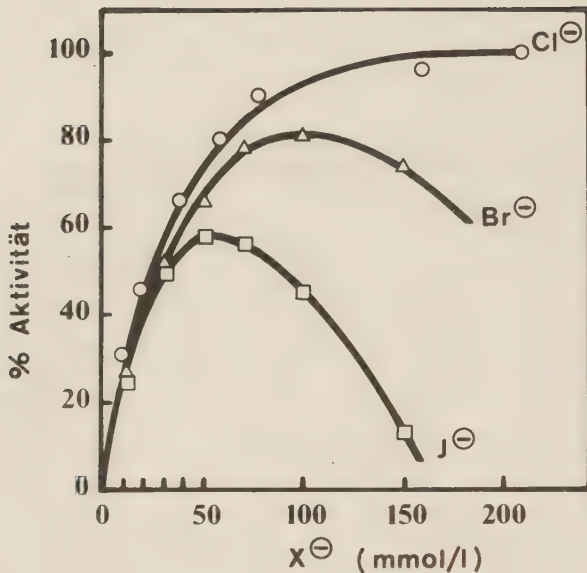


Abb. 34.

Stimulation der Aktivität der Protonenpumpe durch Halogenidionen.

Versuchsbedingungen: Präparation der Membranfraktion des E.R. aus DC-Zellen in Pufferlösungen ohne Zusatz von Cl^- ; Homogenisation von DC-Zellen in einem Puffer mit 50 mmol l^{-1} HEPES-KOH (pH 8.0), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 5 mmol l^{-1} K_2SO_4 , 1 mmol l^{-1} EDTA und 0.1 mmol l^{-1} $MgSO_4$; Sedimentation der im RENOGRAFIN-Dichtegradienten aufgetrennten Membranen des E.R. in einem Puffer mit 25 mmol l^{-1} HEPES-KOH (pH 7.5), 5 mmol l^{-1} K_2SO_4 , 1 mmol l^{-1} EDTA und 0.1 mmol l^{-1} $MgSO_4$; Resuspension der pelletierten Membranen in Pufferlösungen mit 25 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 7.0 bzw. pH 6.5) und 250 mmol l^{-1} Saccharose; Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 4 mmol l^{-1} $MgSO_4$, $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} $Na_2\cdot ADP$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} $Na_2\cdot ATP$ und den angegebenen Konzentrationen der Halogenidsalze von Kalium in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ C$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

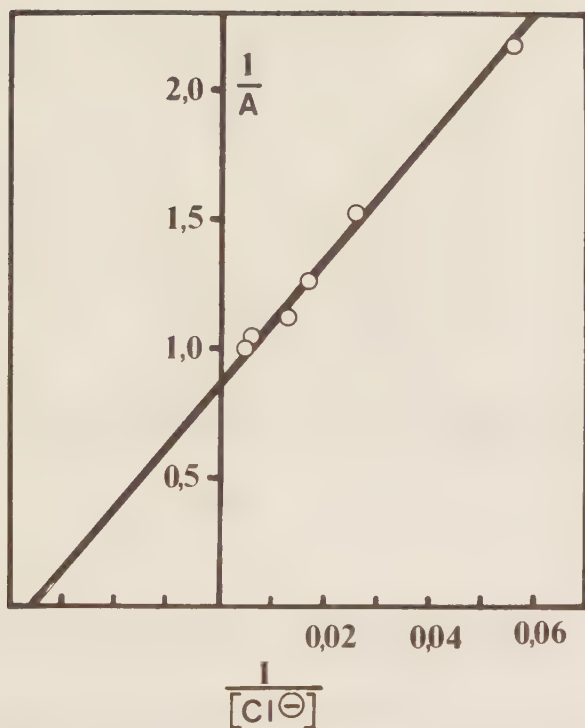


Abb. 35.

LINEWEAVER-BURK-Plot der Aktivität der Protonenpumpe in Abhängigkeit von der $\text{Cl}^\ominus$ -Konzentration.

Die Auftragung der Ergebnisse aus dem Versuch von Abb. 34 im LINEWEAVER-BURK-Plot ergibt für die halbmaximale Stimulation der Protonenpumpe durch $\text{Cl}^\ominus$ einen Wert von $K_m \cong 30 \text{ mmol l}^{-1}$.

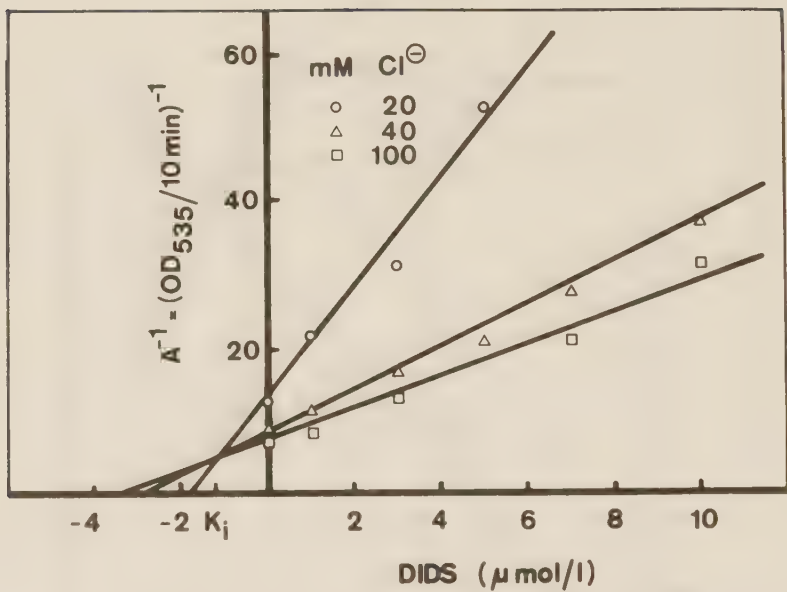


Abb. 36a.

DIXON-Plot der Hemmung der Cl^- -stimulierbaren Protonenpumpe am E.R. durch Hemmstoffe des Anionentransportes: (1) DIDS.

Versuchsbedingungen: Präparation der Membranfraktion des E.R. aus DC-Zellen in Pufferlösungen ohne Zusatz von Cl^- mit den in der Legende von Abb. 34 angegebenen Zusammensetzungen; Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\text{·ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\text{·ATP}$ sowie den angegebenen Konzentrationen von KCl und des Hemmstoffes für den Anionentransport in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$. Auswertung der Versuchsergebnisse im DIXON-Plot.

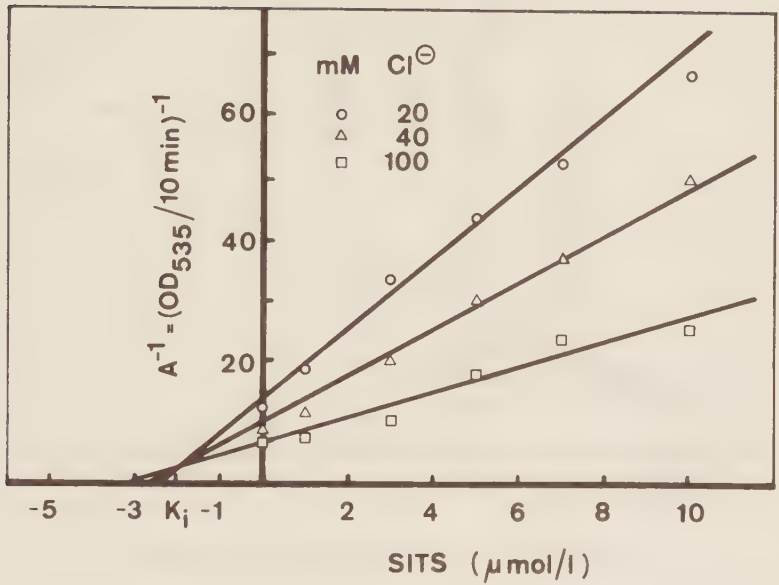


Abb. 36b.

DIXON-Plot der Hemmung der Cl^- -stimulierbaren Protonenpumpe am E.R. durch Hemmstoffe des Anionentransportes: (2) SITS.

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen, die in der Legende von Abb. 36a angegeben sind.

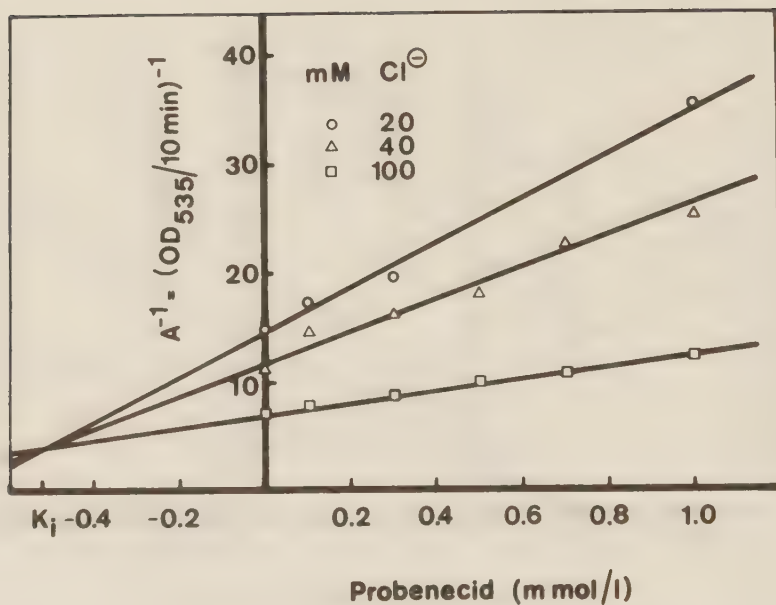


Abb. 37a.

DIXON-Plot der Hemmung der Cl^- -stimulierbaren Protonenpumpe am E.R. durch Hemmstoffe des Anionentransportes: (3) Probenecid.

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen, die in der Legende von Abb. 36a angegeben sind.

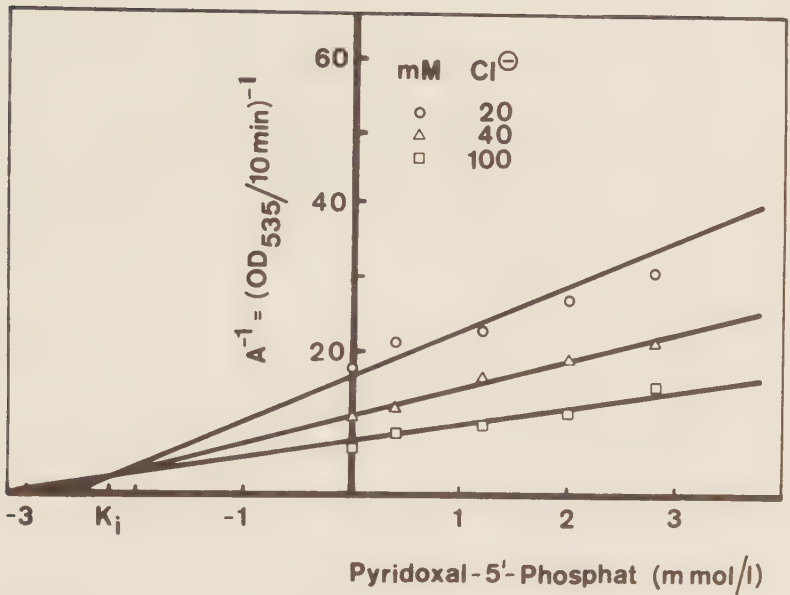


Abb. 37b.

DIXON-Plot der Hemmung der Cl^- -stimulierbaren Protonenpumpe am E.R. durch Hemmstoffe des Anionentransportes: (4) Pyridoxal-5'-phosphat.

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen, die in der Legende von Abb. 36a angegeben sind.

Tabelle 4.

Wirkung von ionophoren Substanzen auf die ATP-abhängige Protonentranslokation am E.R.

ionophore Substanz (10 $\mu\text{mol l}^{-1}$)	Ionenselektivität nach PRESSMAN (1976)	relatives Ausmaß der Protonen- translokation	
		- KCl	+ KCl
Gramicidin	$\underline{\text{H}} > \text{Cs} \approx \text{Rb} > \text{NH}_4 > \underline{\text{K}} > \text{Na} > \text{Li}$	25	26
Valinomycin	$\text{Rb} > \underline{\text{K}} > \text{Cs} > \text{Ag} > \text{Tl} \gg \text{NH}_4 > \text{Na}$	100	22
A 23187	$\text{Mn} > \text{Ca} > \underline{\text{Mg}} > \text{Sr} > \text{Ba}$	40	14
— (Kontrolle)	—	100	100

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-NaOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 4 mmol l^{-1} MgCl_2 , Ab- und Anwesenheit von 100 mmol l^{-1} KCl, 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NR und 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ der angegebenen ionophoren Substanzen sowie 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichs- bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$ in der Meßküvette; Inkubation über 10 min bei +25°C; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

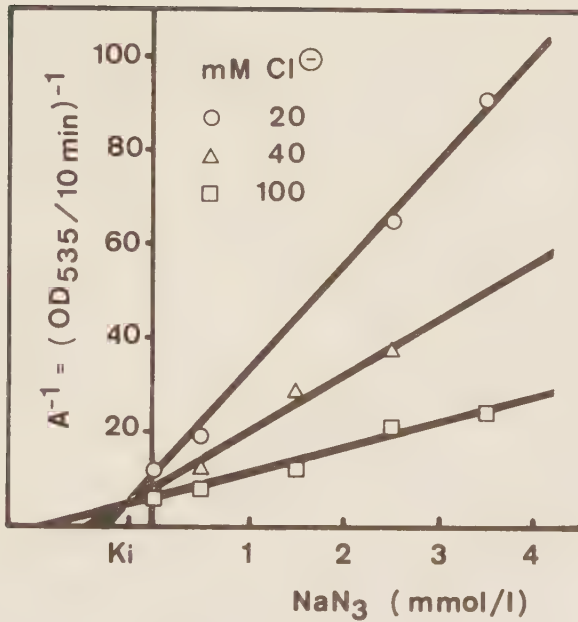


Abb. 38.

DIXON-Plot der Hemmung der Cl^- -stimulierbaren Protonenpumpe am E.R. durch Hemmstoffe des Anionentransportes: (5) Natriumazid.

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen, die in der Legende von Abb. 36a angegeben sind.

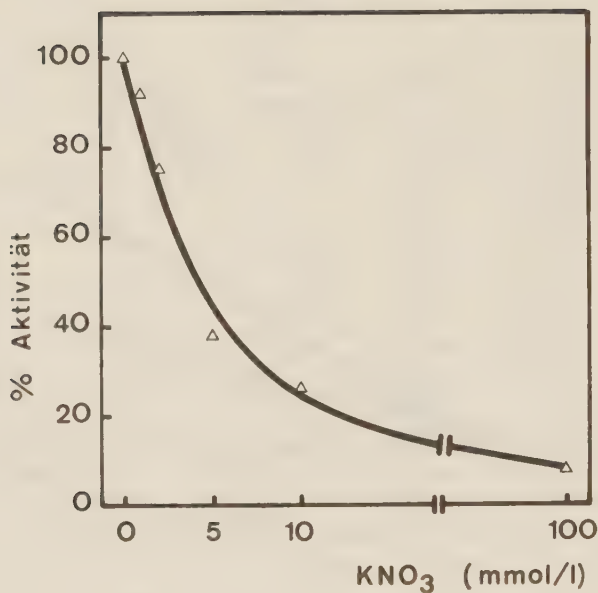


Abb. 39.

Hemmung der $\text{Cl}^\ominus$ -stimulierbaren Protonenpumpe am E.R. durch $\text{NO}_3^\ominus$.

Versuchsbedingungen: Präparation der Membranfraktion des E.R. aus DC-Zellen in Pufferlösungen ohne Zusatz von $\text{Cl}^\ominus$ mit den in der Legende von Abb. 34 angegebenen Zusammensetzungen; Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$ und den angegebenen Konzentrationen an KNO_3 in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

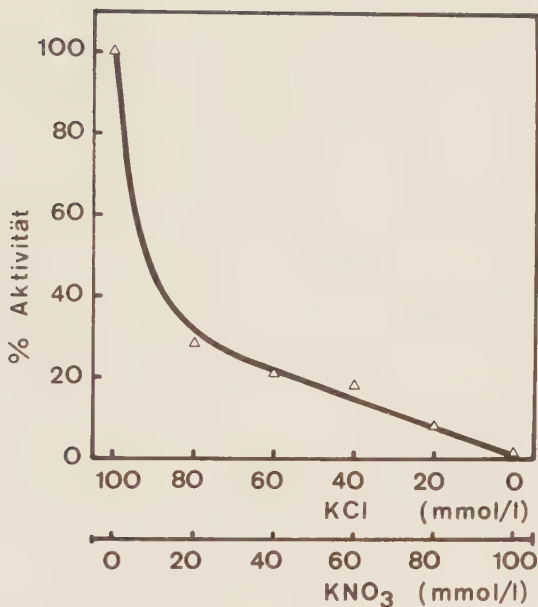


Abb. 40.

Aktivität der $\text{Cl}^\ominus$ -stimulierbaren Protonenpumpe am E.R. bei einer konstanten $\text{K}^\oplus$ -Konzentration und einem Austausch von $\text{Cl}^\ominus$ gegen $\text{NO}_3^\ominus$.

Versuchsbedingungen: Präparation der Membranfraktion des E.R. aus DC-Zellen in Pufferlösungen ohne Zusatz von $\text{Cl}^\ominus$ mit den in der Legende von Abb. 34 angegebenen Zusammensetzungen; Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$ und den angegebenen Konzentrationen von KCl und KNO_3 in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

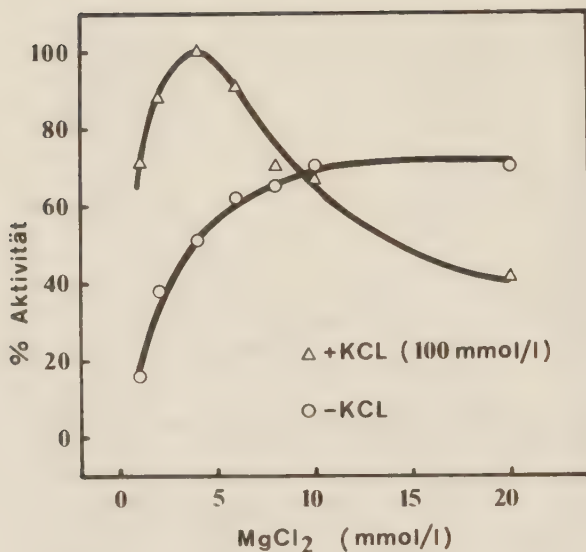


Abb. 41.

Aktivität der Cl^- -stimulierbaren Protonenpumpe in Abhängigkeit von der Konzentration an Mg^{2+} .

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, den angegebenen Konzentrationen an MgCl_2 ohne bzw. mit Zusatz von 100 mmol l^{-1} KCl, $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichs- bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP in der Meßküvette; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

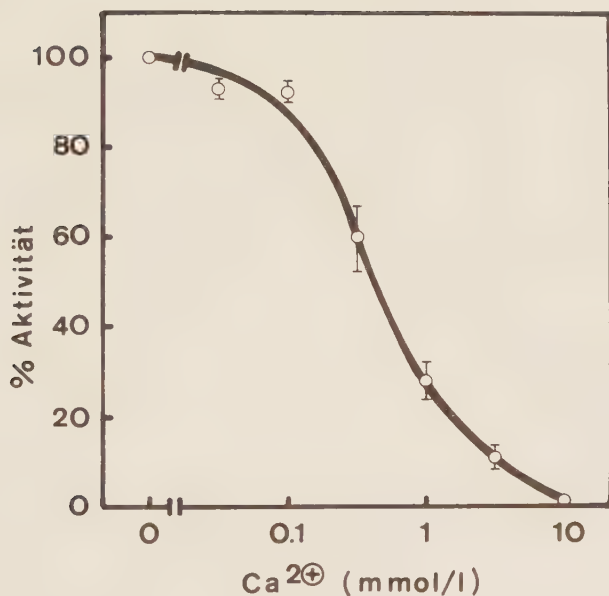


Abb. 42.

Ca^{2+} -Wirkung auf den durch die Cl^- -stimulierbare Protonenpumpe aufgebauten pH-Gradienten an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP und den angegebenen Konzentrationen von CaCl_2 in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

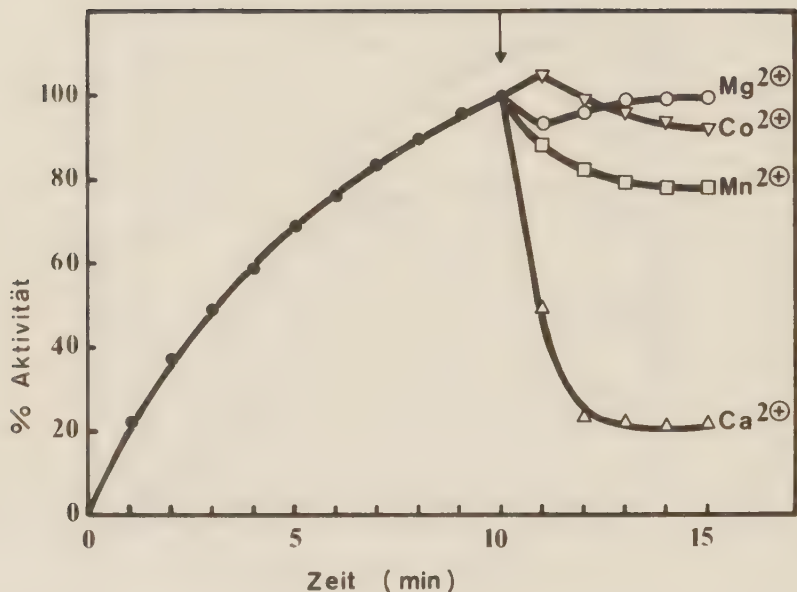


Abb. 43.

Wirkung von zweiwertigen Metallkationen auf den durch die ATP-abhängige Protonentranslokation aufgebauten pH-Gradienten an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichs- bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP in der Meßküvette; nach Aufbau des pH-Gradienten Zugabe von jeweils 4 mmol l^{-1} der Cl^- -Salze der angegebenen Metalle; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

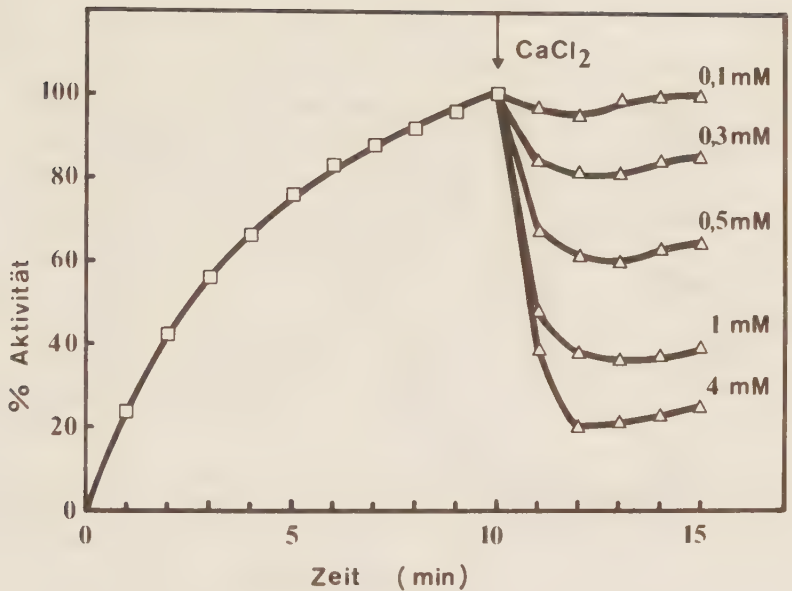


Abb. 44.

Abbau des durch die ATP-abhängige Protonentranslokation aufgebauten pH-Gradienten an Membranen des E.R. in Abhängigkeit von der Konzentration an Ca^{2+} .

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichs- bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP in der Meßküvette; nach Aufbau des pH-Gradienten Zugabe der angegebenen Konzentrationen von CaCl_2 ; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

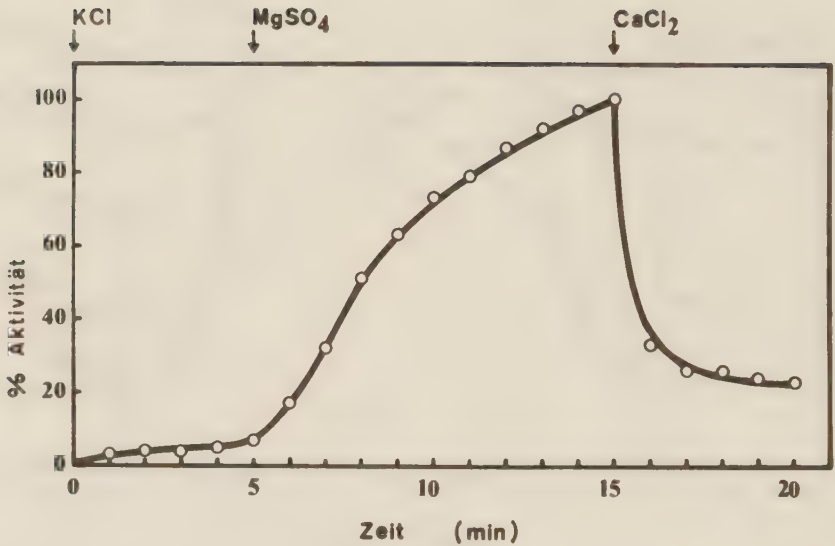


Abb. 45.

Wirkung der zeitlich versetzten Zugabe von $\text{Cl}^{\ominus}$, $\text{Mg}^{2\oplus}$ und $\text{Ca}^{2\oplus}$ auf die ATP-abhängige Protonentranslokation an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NR, 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichs- bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$ in der Meßküvette; Zugabe von 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 sowie 4 mmol l^{-1} CaCl_2 zu den angegebenen Zeiten; Inkubation bei $+25^{\circ}\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

Tabelle 5.

Auxinstimulation der ATP-abhängigen Protonentranslokation am E.R.

Auxinkonzentration (mol l ⁻¹)	relatives Ausmaß der Protonentranslokation		
	IAA	NAA	2.4-D
—	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
10 ⁻¹⁰	110 ± 11	-	-
10 ⁻⁹	121 ± 3	127 ± 15	88 ± 11
10 ⁻⁸	110 ± 7	116 ± 5	130 ± 17
10 ⁻⁷	112 ± 5	115 ± 8	106 ± 10
10 ⁻⁶	109 ± 5	106 ± 9	102 ± 15
10 ⁻⁵	-	94 ± 13	98 ± 11

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l⁻¹ PIPES-NaOH (pH 6.5), 250 mmol l⁻¹ Saccharose, 50 mmol l⁻¹ KCl, 4 mmol l⁻¹ MgSO₄, 30 µmol l⁻¹ NR sowie 2 mmol l⁻¹ Na₂·ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l⁻¹ Na₂·ATP mit den angegebenen Auxinkonzentrationen in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei +25°C; photometrische Messung der Protonentranslokation bei λ = 535 nm. Angabe der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei Testansätzen.

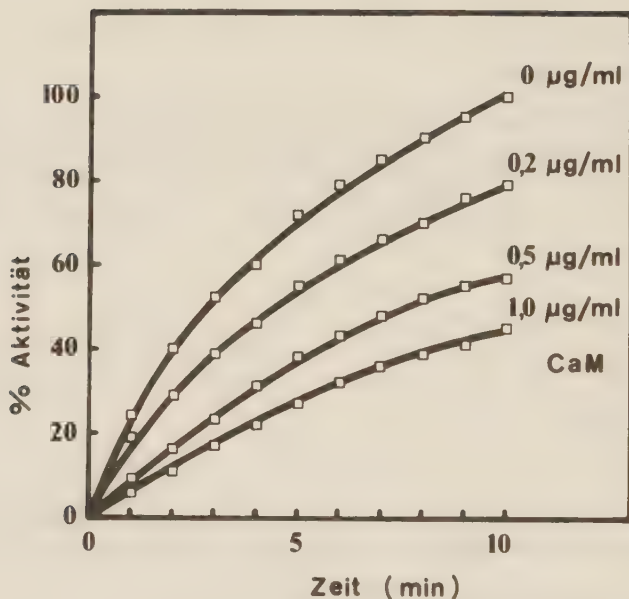


Abb. 46.

Hemmung der ATP-abhängigen Protonentranslokation an Membranen des E.R. durch Calmodulin (CaM).

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , 30 µmol l^{-1} NR, 10 µmol l^{-1} CaCl_2 , den angegebenen Konzentrationen von CaM sowie 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\text{-ADP}$ in der Vergleichs- bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\text{-ATP}$ in der Meßküvette; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

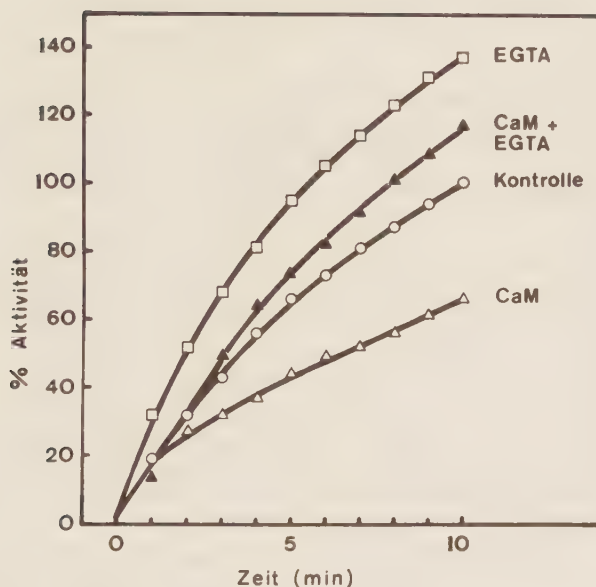


Abb. 47.

Wirkung von EGTA auf die ATP-abhängige Protonentranslokation an Membranen des E.R. in Ab- und Anwesenheit von Calmodulin (CaM).

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ CaCl_2 , in Ab- und Anwesenheit von 1 mmol l^{-1} EGTA, ohne und mit Zusatz von $1 \text{ } \mu\text{g}$ CaM sowie 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichs- bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP in der Meßküvette; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

Tabelle 6.

Auxinstimulation der ATP-abhängigen Protonentranslokation am E.R. in Anwesenheit von Ca^{2+} und Calmodulin (CaM).

Auxinkonzentration (mol l^{-1})	relatives Ausmaß der Protonentranslokation					
	IAA	NAA	2,4-D	PAA	CPIB	BA
—	100	100	100	100	100	100
10^{-10}	144	144	159	129	134	128
10^{-9}	135	140	133	133	134	137
10^{-8}	125	132	138	133	153	124
10^{-7}	138	132	131	133	132	131
10^{-6}	119	122	138	129	139	134

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-NaOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ CaCl_2 , $1 \text{ } \mu\text{g}$ CaM sowie 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP mit den angegebenen Auxinkonzentrationen in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

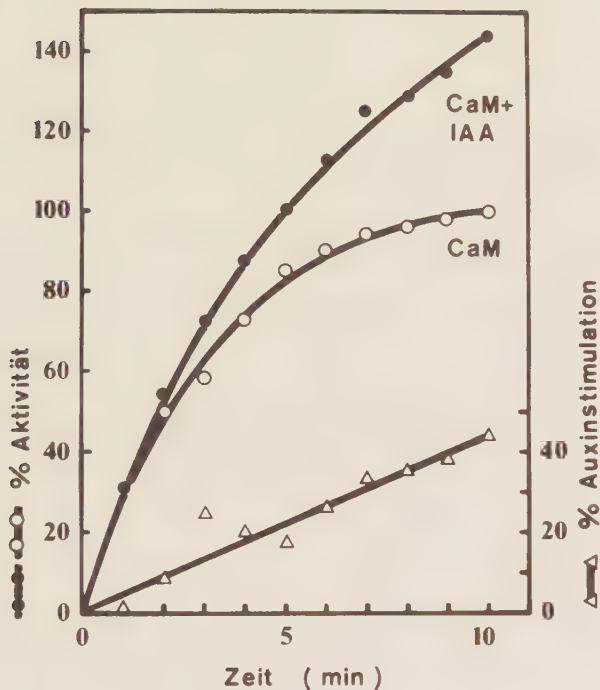


Abb. 48.

Wirkung von Auxin auf die CaM-bedingte Hemmung der ATP-abhängigen Protonentranslokation an Membranen des E.R. in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l⁻¹ PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l⁻¹ Saccharose, 50 mmol l⁻¹ KCl, 4 mmol l⁻¹ MgSO₄, 30 µmol l⁻¹ NR, 10 µmol l⁻¹ CaCl₂, 1 µg CaM sowie 2 mmol l⁻¹ Na₂*ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l⁻¹ Na₂*ATP in Ab- und Anwesenheit von 100 pmol l⁻¹ IAA in den Meßküvetten; Inkubation bei +25°C; photometrische Messung der Protonentranslokation bei λ = 535 nm. Auftragung des Unterschiedes im Ausmaß der Protonentranslokation in Ab- und Anwesenheit von Auxin als relative Auxinstimulation der Reaktion.

Tabelle 7.

Wirkung von Phosphatase-Hemmstoffen auf die ATP-abhängige Protonentranslokation am E.R. in Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} und Calmodulin (CaM).

Hemm- und Kontrollsubstanzen	relatives Ausmaß der Protonentranslokation	
	- CaM	+ CaM
— (Kontrolle)	100 ± 0	100 ± 0
0.1 mmol l ⁻¹ Molybdat - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	117 ± 4	133 ± 7
1 mmol l ⁻¹ Vanadat - Na_3VO_4	124 ± 3	202 ± 8
1 mmol l ⁻¹ Phosphat - Na_3PO_4	-	82 ± 4
2 mmol l ⁻¹ Fluorid - KF	134 ± 13	238 ± 16
1 mmol l ⁻¹ EGTA -	137 ± 2	170 ± 11

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l⁻¹ PIPES-NaOH (pH 6.5), 250 mmol l⁻¹ Saccharose, 50 mmol l⁻¹ KCl, 4 mmol l⁻¹ MgSO_4 , 30 µmol l⁻¹ NR, 10 µmol l⁻¹ CaCl_2 , Ab- und Anwesenheit von 1 µg CaM, den angegebenen Substanzen sowie 2 mmol l⁻¹ $\text{Na}_2\text{·ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l⁻¹ $\text{Na}_2\text{·ATP}$ in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei +25°C; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$. Angabe der Versuchsergebnisse: Mittelwert und Standardabweichung von drei Testansätzen.

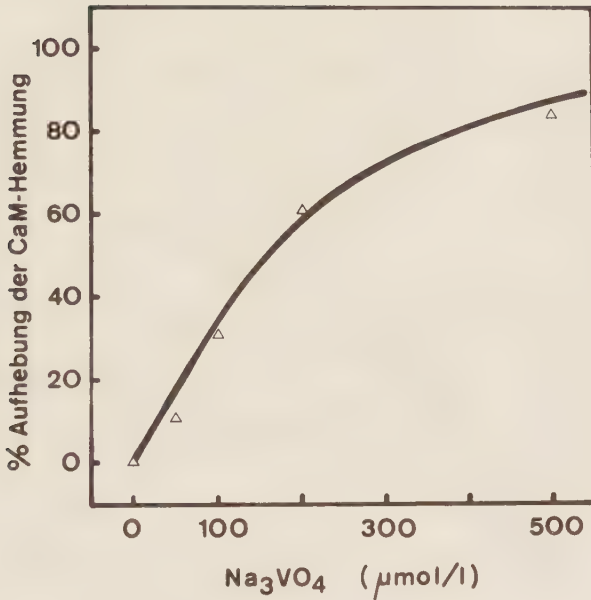


Abb. 49.

Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) auf die CaM-bedingte Hemmung der ATP-abhängigen Protonentranslokation an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ NR, $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ CaCl_2 , $2 \mu\text{g}$ CaM sowie 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP mit den angegebenen Konzentrationen an Na_3VO_4 in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$. Auftragung des Unterschiedes im Ausmaß der Protonentranslokation in Ab- und Anwesenheit von Na_3VO_4 als relative Aufhebung der CaM-bedingten Hemmung der Reaktion.

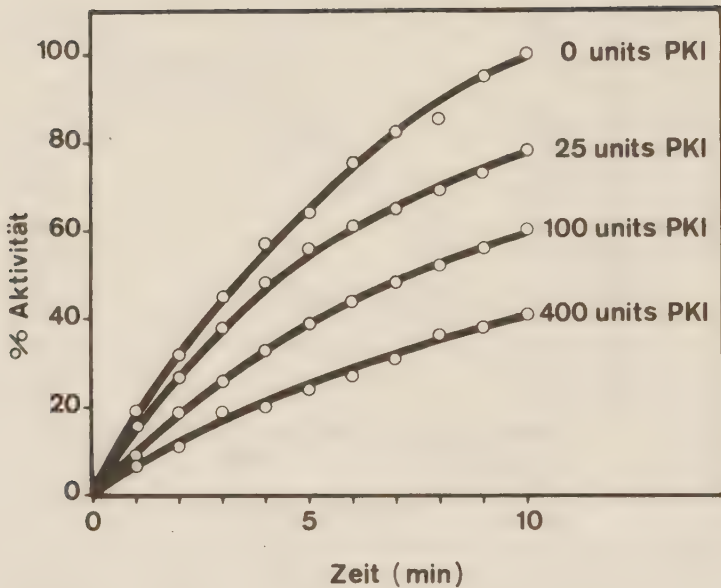


Abb. 50.

Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung des aus Schweineherz isolierten Proteinkinaseinhibitors (PKI) auf die ATP-abhängige Protonentranslokation an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ NR sowie 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP mit den angegebenen Konzentrationen des PKI in den Meßküvetten; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

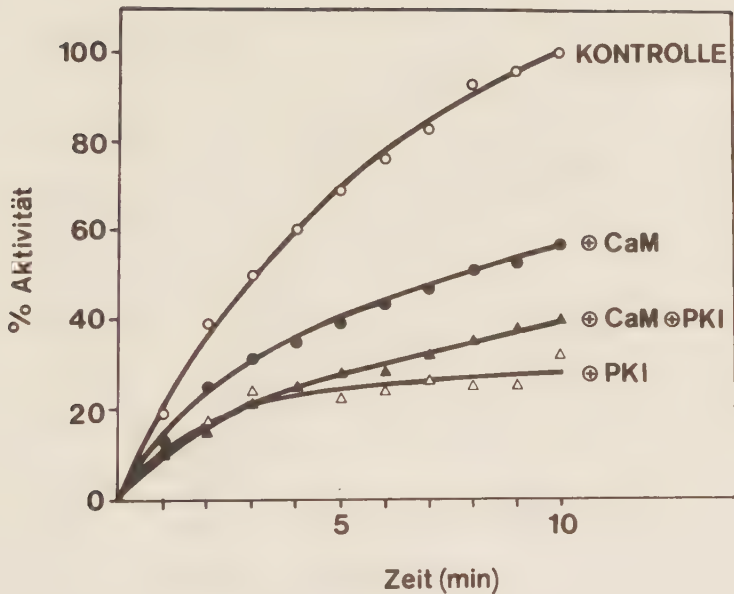


Abb. 51.

Wechselwirkung von Calmodulin (CaM) und dem aus Kaninchenmuskel isolierten Proteinkinaseinhibitor (PKI) auf die ATP-abhängige Protonentranslokation an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ NR sowie 2 mmol l^{-1} Na_2^+ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2^+ATP mit dem Zusatz von $1 \mu\text{g}$ CaM bzw. 240 units PKI oder dem kombinierten Zusatz von CaM und PKI in den Meßküvetten; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

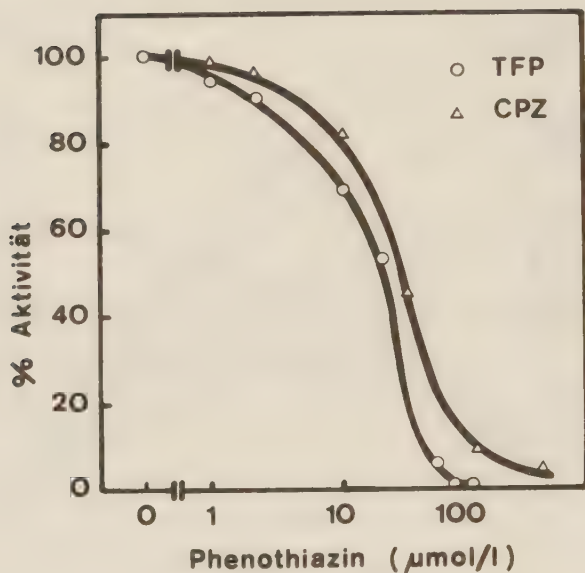


Abb. 52.

Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung der Phenothiazin-derivate Trifluoperazin (TFP) und Chlorpromazin (CPZ) auf die ATP-abhängige Protonentranslokation an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 100 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ NR sowie 2 mmol l^{-1} Na_2ADP in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} Na_2ATP mit den angegebenen Konzentrationen von TFP oder CPZ in den Meßküvetten; Inkubation über 10 min bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

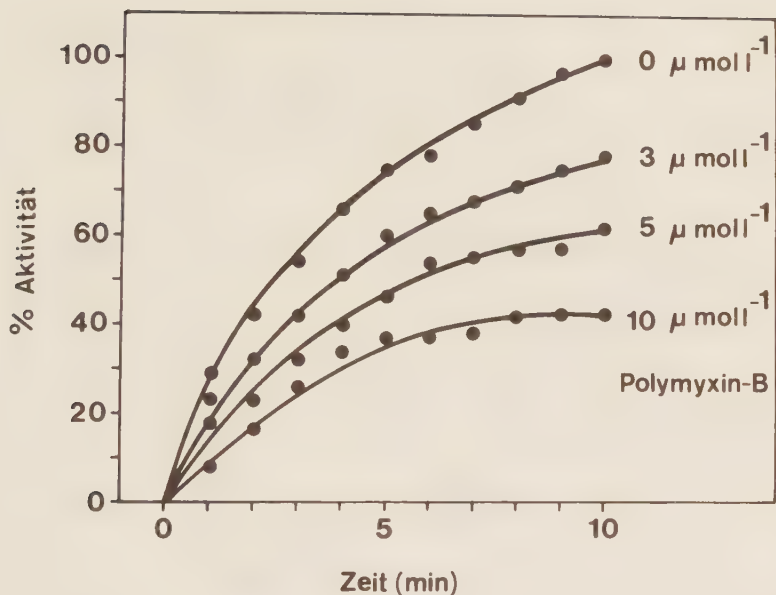


Abb. 53.

Hemmwirkung von Polymyxin-B-sulfat auf die ATP-abhängige Protonentranslokation an Membranen des E.R.

Versuchsbedingungen: Testansatz auf Protonentranslokation mit isolierten Membranvesikeln des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen in einem gepufferten Medium mit 20 mmol l^{-1} PIPES-KOH (pH 6.5), 250 mmol l^{-1} Saccharose, 50 mmol l^{-1} KCl, 4 mmol l^{-1} MgSO_4 , 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NR sowie 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ADP}$ in der Vergleichsküvette bzw. 2 mmol l^{-1} $\text{Na}_2\cdot\text{ATP}$ mit den angegebenen Konzentrationen an Polymyxin-B-sulfat in den Meßküvetten; Inkubation bei $+25^\circ\text{C}$; photometrische Messung der Protonentranslokation bei $\lambda = 535 \text{ nm}$.

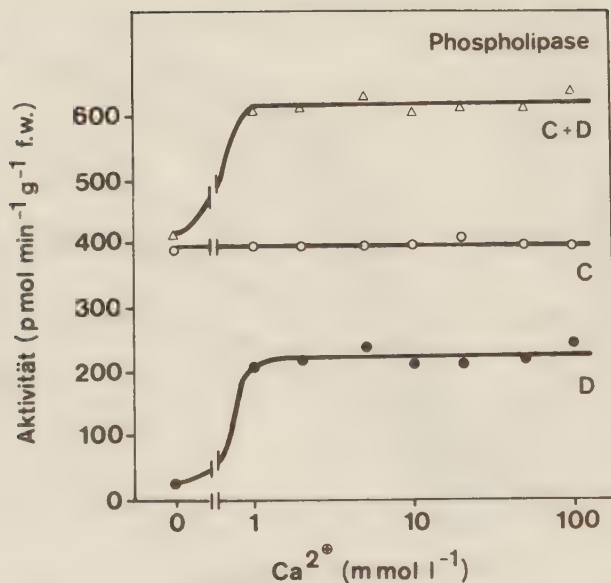


Abb. 54.

Ca²⁺-Wirkung auf die enzymatische Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC): Nachweis von Enzymaktivitäten der Phospholipase C (EC 3.1.4.10) und Phospholipase D (EC 3.1.4.4) an Membranen des E.R.

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen, die für den enzymatischen Test der Phospholipasen im Abschnitt "Material und Methoden" angegeben sind. Die Enzymaktivitäten der Testansätze mit den Membranen des E.R. aus 625 mg Frischgewicht DC-Zellen wurden nach einer Inkubation von 60 min bei +35°C bestimmt.

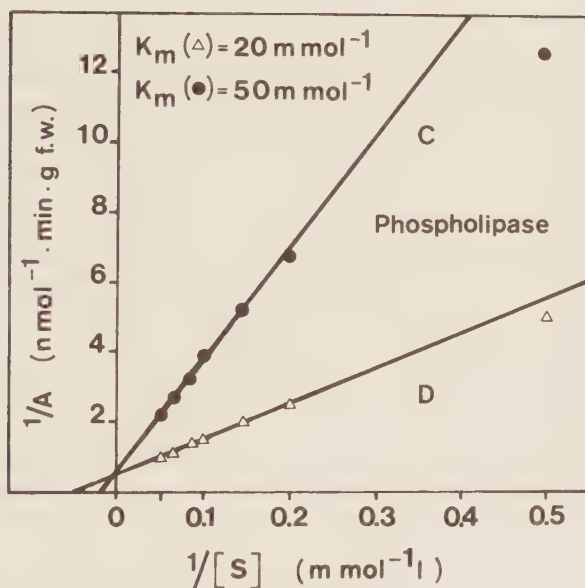


Abb. 55.

LINEWEAVER-BURK-Plot der Enzymaktivität von Phospholipase C (EC 3.1.4.10) und Phospholipase D (EC 3.1.4.4) in Abhängigkeit von der Konzentration von p-Nitrophenylphosphorylcholin (NPPC).

Die Versuchsdurchführung entspricht der, die für den enzymatischen Test der Phospholipasen im Abschnitt "Material und Methoden" angegeben ist, nur daß die Substratkonzentration im angegebenen Bereich variiert und den Testansätzen $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ CaCl}_2$ zugesetzt wurde. Die Enzymaktivitäten der Testansätze mit den Membranen des E.R. aus 750 mg Frischgewicht DC-Zellen wurden nach einer Inkubation von 60 min bei $+25^\circ\text{C}$ bestimmt, und diese Ergebnisse im LINEWEAVER-BURK-Plot ausgewertet.

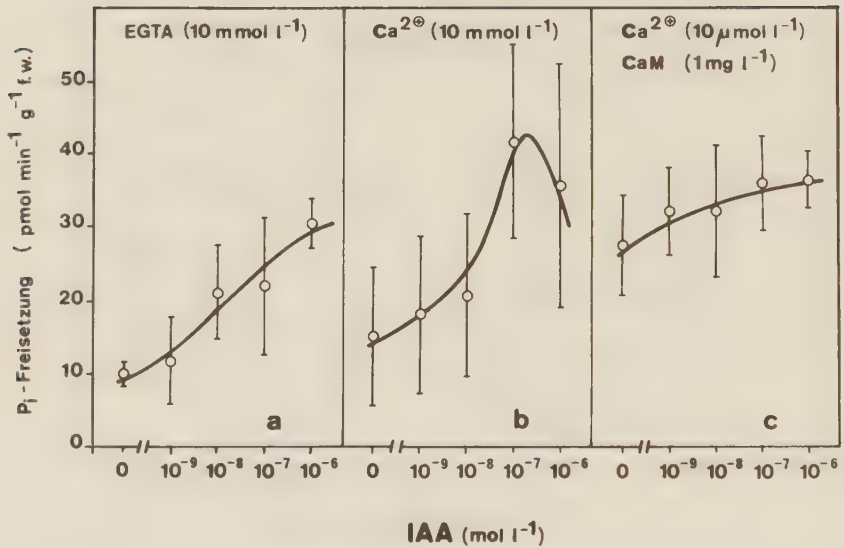


Abb. 56.

Wirkung von Auxin auf die Freisetzung von membrangebundenem Phosphat bei der Inkubation von isolierten Membranen des E.R.

Die Versuchsdurchführung entspricht der, die im Abschnitt "Material und Methoden" angegeben ist. Die Testansätze mit isolierten Membranen aus jeweils 1,25 g Frischgewicht DC-Zellen wurden bei den angegebenen Konzentrationen von IAA in Anwesenheit von 10 mmol l⁻¹ EGTA (a), von 10 mmol l⁻¹ CaCl₂ (b) sowie von 10 μmol l⁻¹ CaCl₂ und 1 mg l⁻¹ CaM (c) inkubiert.

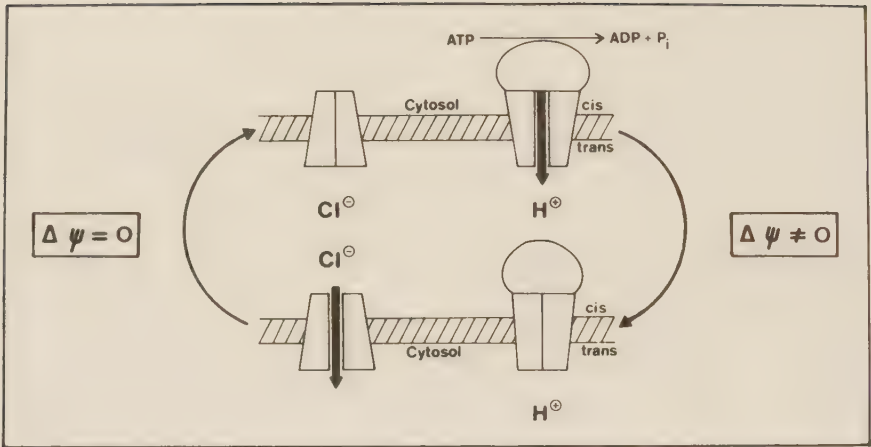


Abb. 57.

Hypothese zum Mechanismus der funktionellen Kopplung der protonentranslozierenden ATPase mit dem Cl^- -spezifischen Anionenkanal.

In Abwesenheit von stimulierenden Cl^- -Ionen transloziert die membran-gebundene ATPase am E.R. nur eine begrenzte Anzahl von H^+ , so daß die trans-Seite der Membran positiv aufgeladen wird, d.h. die Membran hyperpolarisiert wird ($\Delta\psi \neq 0$). Diese Hyperpolarisation der Membran bewirkt eine Hemmung der Protonentranslokation der ATPase, überführt aber den Anionenkanal von einem für den Anionenflux geschlossenen zu einem geöffneten Zustand. In Anwesenheit von stimulierenden Cl^- -Ionen auf der cis-Seite der E.R.-Membran wird dann ein Anionenflux durch die Membran möglich, der zu einer Depolarisation der Membran und in diesem Zustand zu einer erneuten Protonentranslokation durch die ATPase führt. Diese funktionelle Kopplung von ATPase und Anionenkanal über das Membranpotential ($\Delta\psi$) bewirkt schließlich einen ständigen elektroneutralen H^+/Cl^- -Symport an der E.R.-Membran, so daß ein im Ausmaß beträchtlicher pH-Gradient ($\Delta\text{pH} \ll 7$) aufgebaut werden kann.

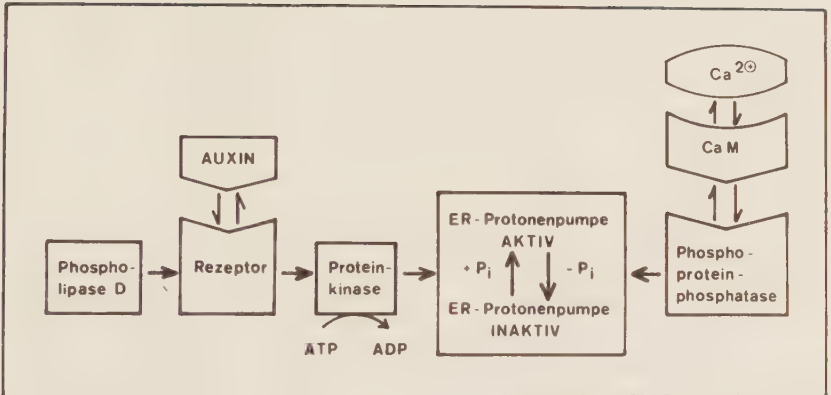


Abb. 58.

Hypothese: Auxin und Calmodulin (CaM) regulieren die Aktivität der anionenstimulierbaren Protonenpumpe am E.R. über den Mechanismus der reversiblen Proteinphosphorylierung.

Die Ergebnisse über die Regulation der ATP-abhängigen $\text{Cl}^\ominus$ -stimulierbaren Protonentranslokation an Membranen des E.R. lassen vermuten, daß diese Protonenpumpe durch eine Phosphorylierung des Proteins aktiviert sowie durch eine Dephosphorylierung des Phosphoproteins abgeschaltet wird und die dafür verantwortlichen Enzyme, nämlich die Proteinkinase (EC 2.7.1.37) indirekt durch Auxin sowie die Phosphoproteinphosphatase (EC 3.1.3.16) direkt durch CaM kontrolliert werden. Es ist aber noch vollkommen ungeklärt, ob das Protein der protonentranslozierenden ATPase oder das des $\text{Cl}^\ominus$ -spezifischen Anionenkanals reversibel phosphoryliert wird. Offensichtlich ist eine vorausgegangene bzw. gleichzeitige Aktivität der Phospholipase D (EC 3.1.4.4) eine Voraussetzung für die Auxinwirkung.

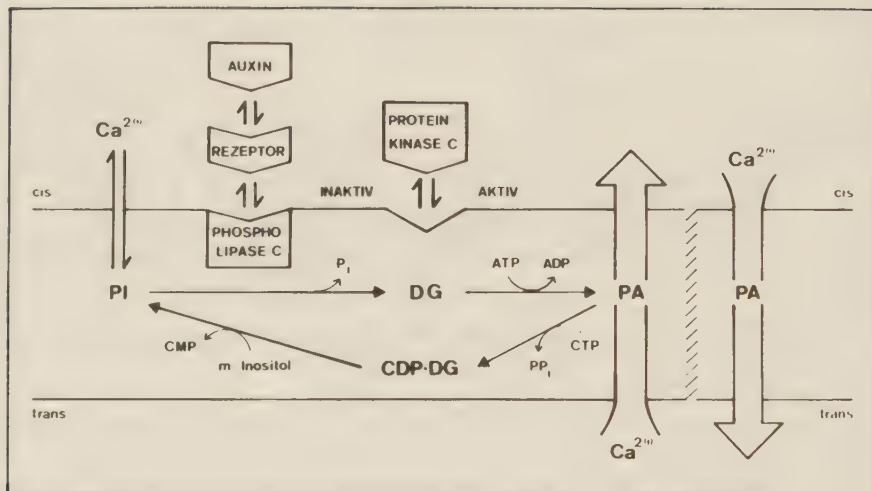


Abb. 59.

Hypothese zum komplexen Mechanismus der von Auxin kontrollierten Primär- und Sekundärreaktionen.

Nach Auswertung der Ergebnisse von fremden und der eigenen Untersuchungen wird angenommen, daß Auxin mit der Besetzung von hochaffinen Bindungsstellen am E.R. nicht nur den Ablauf des Phosphatidylinositol-zyklus (PI-Zyklus) sondern auch die davon abhängigen Prozesse der Proteinphosphorylierung und der Ca^{2+} -Mobilisierung auslöst. Dieser komplexe Mechanismus setzt sich im einzelnen aus folgenden Reaktionen zusammen:

- (1) Auxin bindet reversibel an seine hochaffine Bindungsstelle, und dieser Auxin-Bindungsstellen-Komplex aktiviert die membrangebundene Phospholipase C (EC 3.1.4.10). Die Aktivität dieses Enzyms führt die von Auxin kontrollierte Primärreaktion durch und bewirkt einen Abbau von membrangebundenem Phosphatidylinositol (PI) zu 1,2-Diacylglycerol (DG). Durch den Abbau des anionischen und Ca^{2+} -bindenden PI kommt es zu einer Freisetzung von membrangebundenem Ca^{2+} und Orthophosphat (P_i).
- (2) 1,2-Diacylglycerol (DG) wirkt als ein membrangebundener "second messenger" für die Proteinkinase C, d.h. das Lipid bewirkt die Bindung des Enzyms an die Membran und ermöglicht damit seine katalytische Aktivität. Ein Substratprotein der Proteinkinase C könnte die anionenstimulierbare Protonenpumpe sein (s. Abb. 58).
- (3) Diacylglycerol wird durch die Aktivität der Diacylglycerolkinase (EC 2.7.1.-) unter Verbrauch von ATP zur Phosphatidylsäure (PA) phosphoryliert. Dieses Phospholipid wirkt als endogenes membran-gebundenes Ionophor für Ca^{2+} und führt je nach Lage des Ca^{2+} -Gradienten an der Membran zu einem gerichteten Ca^{2+} -Flux durch die Membran.
- (4) Phosphatidylinositol (PI) wird aus PA durch zwei aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen resynthetisiert. Durch die Aktivität der CTP-Phosphatidylcytidyltransferase (EC 2.7.7.41) wird unter Verbrauch von CTP und bei Freisetzung von Pyrophosphat (PP_i) zunächst $\text{CDP} \cdot \text{DG}$ gebildet, das von der CDP -Diacylglycerol-myo-inositol-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.11) unter Verwendung von myo-Inositol und Freisetzung von CMP zu PI metabolisiert wird. Resynthetisiertes PI kann aufgrund seiner negativen Ladung Ca^{2+} an der Membran binden.

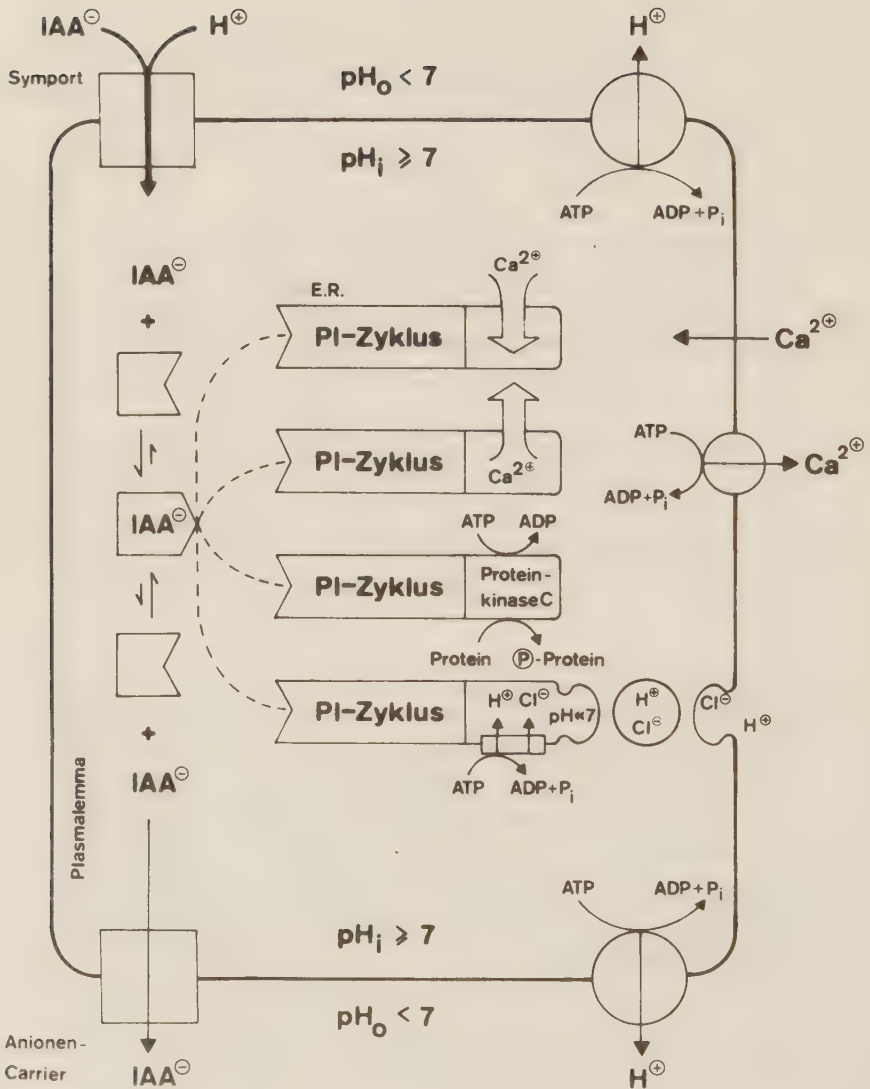


Abb. 60.

Hypothese über das funktionelle Zusammenwirken von Auxintransport und Auxinwirkung in der Pflanzenzelle.

Unter Berücksichtigung der in der Literatur vorhandenen Erkenntnisse über den aktiven und polaren Auxintransport ergibt sich mit der in dieser Arbeit entwickelten Vorstellung über die Auxinwirkung (s. Abb. 59) diese Hypothese über das funktionelle Zusammenwirken von Auxintransport und Auxinwirkung in der Pflanzenzelle. Bei einer gleichmäßigen Verteilung der Transportstellen für den Influx von Auxin ($\text{IAA}^{\ominus}/\text{H}^{\oplus}$ -Symport) über die Gesamtfläche des Plasmalemma sowie bei einer polaren Lokalisation der Transportstellen für den Efflux von Auxin (Anionen-Carrier) im Plasmalemma am basalen Teil der Pflanzenzelle ermöglicht ein chemiosmotischer Transportmechanismus unter Nutzung eines ATP-abhängigen pH-Gradienten (ΔpH) am Plasmalemma den aktiven und polaren Auxintransport. Dies bedeutet, daß der Signalstoff Auxin unter Energieaufwand die Pflanzenzellen gerichtet durchströmt und nur in den Pflanzenzellen Wachstums- und Differenzierungsprozesse auslöst, in denen an intrazellulären Membranen wie am E.R. die die Primärreaktion, d.h. den Ablauf des PI-Zyklus kontrollierenden Auxinrezeptoren vorkommen. In dem Schema wurden auch die Erkenntnisse über den $\text{Ca}^{2\oplus}$ -Transport am Plasmalemma berücksichtigt. Weitere Einzelheiten als auch die für diese Hypothese grundlegenden Literaturstellen finden sich in den einzelnen Abschnitten der "Diskussion".

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie im Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn *Prof. Dr. J. Reinert* danke ich für das Interesse und vor allem für die beständige sowie wohlwollende Unterstützung und Förderung, die mir die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten im Bereich seines Lehrstuhls schufen, um das gewählte Thema bearbeiten zu können.

Herrn *Dr. R. Schmid* danke ich für die Bereitstellung des Spektralphotometers ZEISS DM 4, an dem ich die Messungen zur Protonentranslokation *in vitro* durchführen konnte.

Die zuverlässige und engagierte technische Assistenz von Frau *C. Haubmann* war mir eine große Hilfe. Dafür und für die mit großer Sorgfalt durchgeführte Betreuung der Zellkulturen von *Daucus carota* L. gilt ihr mein besonderer Dank.

Schließlich möchte ich auch den Kolleginnen und Kollegen am Institut danken, die mir mit Kritik und Diskussionsbeiträgen geholfen haben.

Diese Arbeit wurde als Teil eines Projekts im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Steuerung von Differenzierung und Entwicklung bei Eukaryonten durch Hormone und stoffliche Induktoren" von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

9. Lebenslauf

26.11.1950	Geboren in Leipzig als Sohn von Frau Charlotte Zbell, geb. Rülke, und ihres Ehemannes Dr. med. Alfred Zbell
1957-1963	Besuch der Grundschule in Leipzig und in Berlin
1963-1970	Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Berlin-Neukölln
15.01.1970	Zeugnis der Reife
1970-1975	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
26.10.1972	Vordiplom in den Fächern Botanik, Molekularbiologie, Chemie und Physikalische Chemie
1972-1974	Studentische Hilfskraft in einem Forschungsprojekt des SFB 29 "Embryonalpharmakologie" unter der Leitung von Prof. Dr. J. Reinert (Inst. f. Pflanzenphysiol. u. Zellbiol.)
1974-1975	Diplomarbeit über das Thema "Isolierung und Charakterisierung von schnellmarkierten Ribonukleinsäuren aus somatischen Zellkulturen von <i>Daucus carota</i> " unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Reinert (Inst. f. Pflanzenphysiol. u. Zellbiol.)
27.10.1975	Diplom in den Fächern Botanik, Genetik und Biochemie
01.07.1976- 30.06.1981	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie
Juni 1977	Beginn der Dissertation "Über die molekulare Wirkung von Auxin. Biochemische Untersuchungen an isolierten Membranen aus in vitro-kultivierten Zellen von <i>Daucus carota</i> L." in der Abteilung von Prof. Dr. J. Reinert (Inst. f. Pflanzenphysiol. u. Zellbiol.)

01.04.1982- Wissenschaftlicher Mitarbeiter in einem
31.08.1983 Forschungsprojekt im Rahmen des DFG-Schwerpunkt-
programmes "Steuerung von Differenzierung und
Entwicklung bei Eukaryonten durch Hormone und
stoffliche Induktoren".

